

Procédé de détection et/ou d'identification de l'espèce animale d'origine de la
matière animale contenue dans un échantillon.

La présente invention a trait au domaine de la détermination d'une
5 espèce animale appelée ci-après d'origine dans un échantillon susceptible de
contenir un ingrédient, lui-même obtenu à partir d'au moins ladite espèce. Les
produits à partir desquels s'exerce la détermination selon la présente invention
sont par exemple des aliments ou denrées alimentaires à destination de
l'homme ou des animaux, des produits cosmétiques, et, de manière générale
10 des produits susceptibles de contenir des ingrédients d'origine animale, ou au
contraire des produits dans lesquels ces extraits sont interdits.

Par exemple, l'identification des espèces animales présentes dans
les aliments peut être nécessaire dans de nombreux domaines d'activités. Une
première raison est de lutter contre les fraudes alimentaires où sont
15 substituées certaines espèces animales par des espèces moins chères,
comme le remplacement de lièvre par du lapin. Une seconde raison est de
santé publique, comme notamment lors de l'épidémie d'encéphalite
spongiforme bovine ou ESB, maladie due à l'utilisation de farines animales
carnées d'origine bovine pour l'alimentation des bovins. Une troisième raison
20 est d'ordre religieux, afin de vérifier par exemple l'absence de porc dans les
aliments. Une quatrième raison est d'ordre législatif, lors notamment de la
vérification de l'absence d'espèces protégées dans les aliments.

Trois principales approches d'identification sont actuellement
décrites dans la littérature ; ces méthodes sont basées sur une analyse
25 tissulaire ou microscopique, sur une analyse protéique, et/ou sur une analyse
génétique.

L'analyse tissulaire consiste ainsi à déterminer la présence dans
des échantillons de farines destinées à l'alimentation animale, de fragments
d'os. Cette technique, décrite notamment dans l'article de Michard, Revue de
30 l'alimentation animale, vol. 508, pp 43-48, 1997, bien que sensible, est
fastidieuse et repose sur l'interprétation d'un expert. Elle est donc difficilement
comparable d'un laboratoire à un autre. De plus, par nature, elle ne peut
détecter l'adjonction de tissus mous, tels que abats, sérum, tissus sanguins,
gélatine.

Parmi les analyses protéiques utilisées, on distingue principalement dans la littérature trois groupes de méthodes permettant l'identification d'espèces animales présentes dans un échantillon donné.

Le premier groupe de méthodes comprend des techniques d'électrophorèse de protéines, qui consiste à détecter les protéines cibles solubles par une coloration enzymatique spécifique. Le diagnostic est obtenu après électrophorèse sur gel polyacrylamide par exemple. Toutefois, cette technique ne peut être réalisée qu'avec des tissus frais ou congelés, non transformés, car une période de cuisson de l'aliment est un exemple de transformation susceptibles d'altérer les protéines. Cette technique ne peut donc pas être appliquée à la détection d'espèces animales présentes dans les farines végétales, qui subissent lors de leur fabrication des phases de cuisson.

Le deuxième groupe de méthodes est basé sur des techniques immunologiques, par l'utilisation d'anticorps dirigés contre les protéines cibles solubles. La technique « Ouchterlony », ou immunodiffusion double, méthode utilisée pour différencier des antigènes dans un mélange, peut être utilisée. Mais cette technique présente l'inconvénient majeur d'impliquer des réactions croisées avec les épitopes d'autres espèces. L'utilisation de techniques ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) permet une meilleure discrimination entre les espèces, et ces techniques peuvent être appliquées à de la viande cuite lorsque des anticorps dirigés contre des épitopes thermorésistants sont utilisés. Toutefois, des problèmes de spécificité sont encore observés. A titre indicatif, des anticorps polyclonaux dirigés contre les épitopes thermorésistants de poulet ne sont pas suffisamment spécifiques pour déterminer s'il s'agit de viande de poulet ou de viande de dinde.

Le troisième groupe de méthodes comprend les techniques chromatographiques (HPLC) utilisées pour caractériser des protéines solubles de muscles. Toutefois, ces techniques restent lourdes financièrement et techniquement, et ne peuvent être appliquées qu'à des tissus frais ou récemment congelés.

Les inconvénients de ces trois méthodes sont principalement dus à leur dépendance envers la caractérisation de protéines qui sont thermosensibles, se dénaturent lors d'une période de cuisson des aliments, perdent leur activité biologique après la mort de l'animal, et dont la présence est souvent fonction du type de cellules qui est examiné.

Il est ainsi préférable d'analyser directement l'ADN, plutôt que les protéines de l'échantillon, pour identifier la ou les espèces animales d'origine présentes dans un échantillon donné, l'ADN étant identique dans tous les types cellulaires d'un même animal et stable en comparaison avec les
5 protéines. Une troisième approche consiste donc à analyser l'ADN présent dans l'échantillon. Depuis peu de temps, on trouve ainsi dans la littérature des méthodes basées notamment sur l'utilisation d'enzymes de restriction ou de marqueurs génétiques, ces méthodes présentant l'avantage de pouvoir être appliquées à des produits transformés, en particulier après traitement
10 thermique.

La détermination nucléique peut faire appel à des enzymes de restriction, ou technique dite RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, voir notamment Meyer et al, Journal of AOAC International, vol 78 n°6, pp 1542-1551, 1995). Les enzymes de restriction coupent l'ADN,
15 préalablement extrait de l'échantillon à analyser, à des endroits précis de la macromolécule. Il suffit alors de comparer, par simple électrophorèse, les fragments obtenus avec ceux d'échantillons témoins représentatifs de l'espèce à identifier. Toutefois, l'analyse des résultats obtenus par cette technique est très délicate, en particulier lorsque plusieurs espèces animales sont présentes
20 dans l'échantillon.

La détermination nucléique peut aussi consister à séquencer un marqueur ubiquitaire, tel que le cytochrome B de l'ADN mitochondrial. L'ADN mitochondrial est une cible connue pour ce genre d'analyse puisque chaque mitochondrie contient de une à dix molécules d'ADN mitochondrial, et chaque
25 cellule renferme de quelques dizaines à quelques milliers de mitochondries, ce qui permet de travailler sur une très faible quantité d'échantillon. Ainsi, Bartlett & Davidson (Biotechniques, vol. 12, n°3, 1992) décrivent une méthode appelée FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing). Cette méthode consiste à i) isoler l'ADN présent dans un échantillon biologique, ii) amplifier
30 cet ADN par PCR par l'utilisation d'amorces spécifiques du gène cytochrome B mitochondrial, les amorces étant choisies dans la partie du gène hautement conservée au cours de l'évolution et iii) séquencer le segment d'ADN amplifié. La séquence est ensuite utilisée pour une analyse phylogénétique à l'aide d'une base de données, permettant l'identification de l'espèce animale
35 présente initialement dans l'échantillon. Si cette méthode présente l'avantage d'être rapide et utilisable sur tout type d'aliments (frais, congelés,

transformés...), elle présente toutefois l'inconvénient majeur de ne pas permettre l'analyse de mélanges d'espèces, à partir de mélanges de séquences amplifiées issues du même marqueur polymorphe ubiquitaire, et reste ainsi réservée à des matières premières homogènes.

5 L'analyse peut également consister à amplifier un marqueur spécifique d'une espèce donnée. Ainsi, Lahiff et al (Molecular and Cellular Probes, vol.15, pp27-35, 2001) décrivent l'identification d'espèce ovine, bovine ou aviaire présente dans un échantillon par l'utilisation par PCR d'amorces particulières, spécifiques à chaque espèce. Une méthode développée par
10 Colgan S. et al. a été également décrite en 2001 (FOOD Research International, 2001, vol 34, n° 5, 401-414) pour la détection de 4 espèces en mélange par l'utilisation par PCR d'amorces spécifiques. Si cette méthode permet l'identification spécifique et rapide de telle ou telle espèce, elle ne peut être appliquée simultanément à la détection de plusieurs espèces. Des PCR
15 successives sont alors nécessaires si on souhaite détecter plusieurs espèces. On retrouve ainsi dans l'art antérieur la détection de six espèces animales par l'utilisation d'une PCR multiplex (*Matsunaga et al*, 1999 Meat Sciences, (1999), 145-148) et (*Matsunaga T. et al.*, *Nippon Shokuhin KogakuKaishi*, (1999) vol 46, n°3, 187-194). Toutefois, cette technique reste délicate et difficile à
20 appliquer et implique pratiquement une connaissance préalable des espèces recherchées. Cette technique n'est cependant pas applicable en aveugle, c'est à dire sans connaissance préalable des espèces susceptibles d'être présentes dans l'échantillon. Elle ne permet pas d'avoir des résultats quantitatifs en raison des difficultés dues à l'amplification multiplex et des
25 possibilités de mésappariements. De plus, cette technique oblige à disposer d'un grand nombre d'amorces spécifiques si l'on veut tester un grand nombre d'espèces, ce qui est peu réalisable en pratique en raison de problèmes de sensibilité et de spécificité. Enfin, si une espèce n'est pas représentée dans le jeu d'amorces mais néanmoins présente dans l'échantillon à analyser, le
30 résultat sera faussé.

Les techniques précédemment décrites permettent la détermination sans connaissance préalable de l'espèce présente lorsque l'échantillon ne comprend qu'une seule espèce, elles permettent la détection de plusieurs espèces lorsqu'on a une connaissance préalable des espèces en
35 présence mais, aucune des techniques précédemment décrites ne permet une détermination en présence d'un mélange de plusieurs espèces sans

connaissance préalable desdites espèces en présence. De plus la plupart des techniques précédemment décrites lorsqu'on est en présence de plusieurs espèces ne permettent pas une détermination fiable lorsque les proportions des différentes espèces sont très différentes dans l'échantillon.

5 Il existe donc un besoin important pour une technique qui, tout en restant générique, puisse détecter une ou plusieurs espèces, même présentes en grand nombre dans le même échantillon à analyser ou en très faible quantité, et sans connaissance préalable des espèces présentes.

En effet, si dans un produit, l'espèce non désirée doit être présente
10 dans des quantités supérieures à 5 % voire 1% selon les législations par rapport à l'espèce normalement présente pour qu'il y ait effectivement fraude, ce qui allège les performances exigées pour le test de diagnostic moléculaire, il en est autrement dans le cas de produits dans lesquels la présence de produits d'origine animale est interdite. Par exemple dans le cas des farines
15 employées en France pour l'alimentation animale depuis le 1^{er} janvier 2001, les traces de teneur en produit d'origine animale sont recherchées, et la contrainte technique est importante en terme de sensibilité de la méthode car la majeure partie du matériel est d'origine végétale et l'adjonction de matériel animal varie entre 0,1 et 5% poids/poids.

20 Il existe donc un besoin de disposer d'un outil de détermination, permettant l'identification ou la détection qualitative et/ou quantitative d'espèces animales, en aveugle, c'est à dire sans a priori sur l'identité de l'espèce recherchée, susceptible d'être mis en œuvre de manière simple, tout en restant spécifique, fiable et fidèle, et susceptible d'être mis en œuvre dans
25 un milieu pouvant contenir des ingrédients obtenus à partir de plusieurs espèces animales.

Le problème à résoudre présente une complexité importante. La détermination doit être possible en aveugle, c'est à dire que l'échantillon est susceptible de contenir ou de ne pas contenir des ingrédients obtenus à partir
30 d'une ou de plusieurs espèces animales et ces espèces d'origine sont inconnues. Si l'échantillon contient des ingrédients obtenus à partir d'espèces animales, les espèces d'origine doivent être déterminées et sont susceptibles d'être voisines, et la détermination doit être possible en ne faisant qu'une seule analyse, avec un seul réactif et une seule étape d'amplification, sans étape
35 préalable de prédétermination par exemple du groupe d'espèces ou mise en

œuvre de batteries de tests permettant par exemple de classer les réactifs par genres ou espèces pour éviter par exemple les réactions croisées.

A cet effet, la Demanderesse a découvert un ensemble de séquences constitué par le groupe comprenant les séquences SEQ ID Nos 1 à 5 232, 242 à 261, leurs séquences respectivement complémentaires, et toutes séquences homologues, comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence, qui permettent par la mise en œuvre de méthodes d'analyse dites de biologie moléculaire, la détermination 10 d'au moins une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce.

Avant d'exposer l'invention, différents termes utilisés dans la description et les revendications sont définis ci-après.

- Une "détermination" s'entend comme étant l'identification ou la 15 détection ou analyse quantitative et/ou qualitative d'une espèce animale.

- Une "espèce animale" s'entend comme étant la catégorie la plus simple utilisée dans le classement des espèces vivantes ou taxonomie. Les espèces vivantes sont classées en catégories appelées taxons, les plus importants taxons sont le Règne (animal ou végétal), l'Embranchement, la 20 Classe, l'Ordre, la Famille, le Genre, et l'Espèce. Les Oiseaux, Poissons et Mammifères sont des classes d'animaux vertébrés.

- Par "espèce animale d'origine" on entend l'espèce animale, de l'animal dont les tissus, quels qu'ils soient, ont été utilisé comme matière première pour la préparation du ou des ingrédients de l'échantillon. du produit 25 soumis à la détermination selon la présente invention.

- Une "méthode de biologie moléculaire", est une méthode basée sur l'amplification enzymatique de cibles nucléiques (ADN et/ou ARN) in vitro et l'utilisation de sondes oligonucléotidiques.

- Un "échantillon" est toute partie obtenue directement ou 30 indirectement à partir d'un produit, d'un matériau, d'une matière, de départ, lui-même susceptible de contenir au moins un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce animale dite d'origine. En conséquence de cette définition, l'échantillon à déterminer conformément à la présente invention est susceptible de contenir ledit ingrédient d'origine animale, à partir duquel on identifie ou 35 détecte la ou les espèces animales entrées dans la composition ou constitution du produit, matériau, ou matière de départ. Au sens de la présente invention,

le produit de départ peut être un matériel biologique, un aliment ou denrée alimentaire, par exemple à base de viande ou poisson, un produit cosmétique, etc..

- Par "étape de lyse", on entend une étape capable de libérer les
5 acides nucléiques contenus dans les enveloppes protéiques et/ou lipidiques des microorganismes (comme des débris cellulaires qui perturbent les réactions ultérieures). A titre d'exemple, on peut utiliser les méthodes de lyse telles que décrite dans les demandes de brevet de la Demanderesse :

WO-A-00/05338 sur la lyse mixte magnétique et mécanique,
10 WO-A-99/53304 sur la lyse électrique, et
WO-A-99/15321 sur la lyse mécanique.

L'homme du métier pourra utiliser d'autres méthodes de lyse bien connues, telles que les chocs thermiques ou osmotiques ou les lyses chimiques par des agents chaotropiques tels que les sels de guanidium (US-A-
15 5,234,809).

- Par "purification", on entend la séparation entre les acides nucléiques et les autres constituants cellulaires relargués dans l'étape de lyse. Cette étape permet généralement de concentrer les acides nucléiques. A titre d'exemple, on peut utiliser des particules magnétiques éventuellement
20 revêtues d'oligonucléotides, par adsorption ou covalence (voir à ce sujet les brevets US-A-4,672,040 et US-A-5,750,338), et ainsi purifier les acides nucléiques qui se sont fixés sur ces particules magnétiques, par une étape de lavage. Cette étape de purification des acides nucléiques est particulièrement intéressante si l'on souhaite amplifier ultérieurement lesdits acides nucléiques.
25 Un mode de réalisation particulièrement intéressant de ces particules magnétiques est décrit dans les demandes de brevet déposées par la Demanderesse sous les références suivantes : WO-A-97/45202 et WO-A-99/35500.

Dans la dernière de ces demandes de brevet, il s'agit de particules
30 magnétiques thermosensibles ayant chacune un noyau magnétique recouvert d'une couche intermédiaire. La couche intermédiaire est elle-même recouverte par une couche externe à base d'un polymère susceptible d'interagir avec au moins une molécule biologique, par exemple acide nucléique ; le polymère externe est thermosensible et présente une température critique inférieure de
35 solubilité (LCST) prédéterminée comprise entre 10 et 100°C et de préférence entre 20 et 60°C. Cette couche externe est synthétisée à partir de monomères

cationiques, qui génèrent un polymère ayant la capacité de lier les acides nucléiques. Cette couche intermédiaire isole les charges magnétiques du noyau, afin d'éviter les problèmes d'inhibition des techniques d'amplification de ces acides nucléiques.

5 Un autre exemple intéressant de méthode de purification des acides nucléiques est l'utilisation de silice soit sous forme de colonne (nécessaires Qiagen par exemple), soit sous forme de particules inertes [Boom R. et al., J. Clin. Microbiol., 1990, n°28(3), p. 495-503] ou magnétiques (Merck: MagPrep® Silica, Promega: MagneSil™ Paramagnetic particles). D'autres
10 méthodes très répandues reposent sur des résines échangeuses d'ions en colonne (nécessaires Qiagen par exemple) ou en format particulaire paramagnétique (Whatman: DEAE-Magarose) [Levison PR et al., J. Chromatography, 1998, p. 337-344]. Une autre méthode très pertinente mais non exclusive pour l'invention est celle de l'adsorption sur support d'oxyde
15 métallique (société Xtrana: matrice Xtra-Bind™).

- Une "séquence", ou un "fragment nucléotidique", ou un oligonucléotide, ou un polynucléotide, est un enchaînement de motifs nucléotidiques assemblés entre eux par des liaisons ester phosphorique, caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels,
20 susceptibles de s'hybrider à un fragment nucléotidique, l'enchaînement pouvant contenir des monomères de structures différentes et être obtenu à partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique.

- Un "motif" est dérivé d'un monomère qui peut être un nucléotide
25 naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée ; dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose, dans l'ARN le sucre est le ribose ; selon qu'il s'agisse de l'ADN ou l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine ; ou bien le monomère est un nucléotide
30 modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir soit au niveau des bases, avec des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5désoxyuridine ou toute autre base modifiée capable d'hybridation, soit au niveau du sucre,
35 par exemple le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (P.E. Nielsen et al, Science, 254, 1497-1500 (1991), soit encore au niveau du

groupement phosphate, par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les diphosphates, alkyl- et aryl-phosphonates et phosphorothioates,

- Par "séquence informationnelle", on entend toute suite ordonnée
5 de motifs de type nucléotidique, dont la nature chimique et l'ordre dans un sens de référence constituent une information de même qualité que celle des acides nucléiques naturels.

- Par "hybridation", on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux fragments nucléotidiques, ayant des
10 séquences suffisamment complémentaires sont susceptibles de former un double brin avec des liaisons hydrogène stables et spécifiques. Un fragment nucléotidique "capable de s'hybrider" avec un polynucléotide est un fragment pouvant s'hybrider avec ledit polynucléotide dans des conditions d'hybridation, qui peuvent être déterminées dans chaque cas de façon connue. Les
15 conditions d'hybridation sont déterminées par la stringence, c'est-à-dire la rigueur des conditions opératoires. L'hybridation est d'autant plus spécifique qu'elle est effectuée à plus forte stringence. La stringence est définie notamment en fonction de la composition en bases d'un duplex sonde/cible, ainsi que par le degré de mésappariement entre deux acides nucléiques.

20 La "stringence" peut également être fonction des paramètres de la réaction, tels que la concentration et le type d'espèces ioniques présentes dans la solution d'hybridation, la nature et la concentration d'agents dénaturants et/ou la température d'hybridation. La stringence des conditions dans lesquelles une réaction d'hybridation doit être réalisée dépendra
25 principalement des sondes cibles utilisées. Toutes ces données sont bien connues et les conditions appropriées peuvent être déterminées par l'homme du métier.

En général, selon la longueur des sondes cibles utilisées, la température pour la réaction d'hybridation est comprise entre environ 20 et
30 70°C, en particulier entre 35 et 65°C dans une solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1 M.

- Une "sonde" comprend un fragment nucléotidique comprenant de 5 à 100 monomères, notamment de 6 à 35 monomères, possédant une
spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un
35 complexe d'hybridation avec un fragment nucléotidique ayant, dans le cas présent, une séquence nucléotidique comprise par exemple dans un ARN

ribosomique, l'ADN obtenu par transcription inverse dudit ARN ribosomique et l'ADN (appelé ici ADN ribosomique ou ADNr) dont ledit ARN ribosomique est le produit de transcription ; une sonde peut être de capture ou de détection.

- Une "sonde de capture" est immobilisée ou immobilisable sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption.

- Une "sonde de détection" peut être marquée au moyen d'un marqueur choisi parmi les isotopes radioactifs, des enzymes (notamment une peroxydase, une phosphatase alcaline, ou une enzyme susceptible d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent, des composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorigènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, et des ligands tels que la biotine.

- Une "amorce" comprend un fragment nucléotidique comprenant de 5 à 100 motifs nucléotidiques et possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique, par exemple dans une technique d'amplification, dans un procédé de séquençage, dans une méthode de transcription inverse, etc.

- "L'homologie" caractérise le degré d'identité de deux fragments nucléotidiques comparés, dont les critères retenus pour la présente invention sont définis ci-après.

Les sondes et amorces selon l'invention sont choisies parmi :

(a) les séquences identifiées dans le listage de séquences annexé à la description,

(b) les séquences complémentaires à chacune des séquences identifiées dans le listage de séquences annexé à la description, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C et préférentiellement entre 35 et 65°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M et préférentiellement 0,8 à 1M, avec une quelconque des séquences identifiées dans le listage de séquences annexé à la description,

(c) les séquences homologues à chacune des séquences identifiées dans le listage de séquences annexé à la description, et des séquences complémentaires à chacune des séquences identifiées dans le listage de séquences annexé à la description, respectivement, l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite

d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences, et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence ; à titre d'exemple, un fragment (c) comporte 10 nucléotides parmi lesquels 5 nucléotides contigus appartiennent à une séquence (a) et au moins
5 2 nucléotides des 5 nucléotides restants sont identiques respectivement aux deux nucléotides correspondants dans la séquence de référence, après alignement.

- Par "séquence d'identification", on désigne toute séquence ou tout fragment tel que défini ci-dessus, pouvant servir de sonde de détection
10 et/ou de capture.

- Par "détection" on entend soit une détection directe par une méthode physique, soit une méthode de détection à l'aide d'un marqueur.

De nombreuses méthodes de détection existent pour la détection des acides nucléiques. [Voir par exemple Kricka et al., Clinical Chemistry,
15 1999, n° 45(4), p.453-458 ou Keller G.H. et al., DNA Probes, 2nd Ed., Stockton Press, 1993, sections 5 et 6, p.173-249].

Par "marqueur", on entend un traceur capable d'engendrer un signal. Une liste non limitative de ces traceurs comprend les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence ou
20 luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la bêtagalactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase ; les chromophores comme les composés fluorescents, luminescents ou colorants ; les groupements à densité électronique détectables par microscopie électronique ou par leurs propriétés électriques comme la conductivité, par les
25 méthodes d'ampérométrie ou de voltamétrie, ou par des mesures d'impédance ; les groupements détectables par des méthodes optiques comme la diffraction, la résonance plasmon de surface, la variation d'angle de contact ou par des méthodes physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel, etc. ; les molécules radioactives comme ^{32}P , ^{35}S ou
30 ^{125}I .

Ainsi, le polynucléotide peut être marqué pendant l'étape d'amplification enzymatique, par exemple en utilisant un nucléotide triphosphate marqué pour la réaction d'amplification. Le nucléotide marqué sera un désoxyribonucléotide dans les systèmes d'amplification générant un
35 ADN, comme la PCR, ou un ribonucléotide dans les techniques d'amplification générant un ARN, comme les techniques TMA ou NASBA.

Le polynucléotide peut aussi être marqué après l'étape d'amplification, par exemple en hybridant une sonde marquée selon la technique d'hybridation sandwich décrite dans le document WO-A-91/19812.

Un autre mode particulier préférentiel de marquage d'acides nucléiques est décrit dans la demande FR-A-2 780 059 de la Demanderesse. Un autre mode préférentiel de détection utilise l'activité exonucléase 5'-3' d'une polymérase, tel que décrit par Holland P.M., PNAS (1991) p 7276-7280.

Des systèmes d'amplification du signal peuvent être utilisés comme décrit dans le document WO-A-95/08000 et, dans ce cas, la réaction préliminaire d'amplification enzymatique peut ne pas être nécessaire.

- Par "amplification enzymatique", on entend une processus générant de multiples copies d'un fragment nucléotidique particulier à l'aide d'amorces spécifiques par l'action d'au moins une enzyme. Ainsi, pour l'amplification des acides nucléiques, il existe, entre autres, les techniques suivantes :

- PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159,
- LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-A-0 201 184,
- RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet WO-A-90/01069,
- 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995,
- NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO-A-91/02818, et
- TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5,399,491.

On parle alors d'"amplicons" pour désigner les polynucléotides générés par une technique d'amplification enzymatique.

- Le terme "support solide" tel qu'utilisé ici inclut tous les matériaux sur lesquels peut être immobilisé un acide nucléique. Des matériaux de synthèse ou des matériaux naturels, éventuellement modifiés chimiquement, peuvent être utilisés comme support solide, notamment les polysaccharides tels que les matériaux à base de cellulose, par exemple du papier, des dérivés de cellulose tels que l'acétate de cellulose et la nitrocellulose ou le dextrane, des polymères, des copolymères, notamment à base de monomères du type styrène, des fibres naturelles telles que le coton, et des fibres synthétiques

telles que le nylon ; des matériaux minéraux tels que la silice, le quartz, des verres, des céramiques ; des latex ; des particules magnétiques ; des dérivés métalliques, des gels etc. Le support solide peut être sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une membrane comme décrit dans la demande
5 WO -A-94/12670, d'une particule ou d'une biopuce.

- Par "biopuce", on entend un support solide de dimension réduite où sont fixés une multitude de sondes de capture à des positions prédéterminées.

A titre d'illustration, des exemples de ces biopuces sont donnés
10 dans les publications de [G. Ramsay, Nature Biotechnology, 1998, n°16, p. 40-44 ; F. Ginot, Human Mutation, 1997, n°10, p.1-10 ; J. Cheng et al, Molecular diagnosis, 1996, n°1(3), p.183-200 ; T. Livache et al, Nucleic Acids Research, 1994, n° 22(15), p. 2915-2921 ; J. Cheng et al, Nature Biotechnology, 1998, n° 16, p. 541-546] ou dans les brevets US-A-4,981,783, US-A-5,700,637, US-A-
15 5,445,934, US-A-5,744,305 et US-A-5,807,522.

La caractéristique principale du support solide doit être de conserver les caractéristiques d'hybridation des sondes de capture sur les acides nucléiques tout en générant un bruit de fond minimum pour la méthode de détection. Un avantage des biopuces est qu'elles simplifient l'utilisation de
20 nombreuses sondes de capture permettant ainsi la détection multiple des espèces à détecter.

L'invention décrite ci-après permet de résoudre les problèmes posés par les méthodes précédemment décrites, à la fois en terme de sensibilité, spécificité, capacité de multidétection et identification, tout en étant
25 rapide et facile à mettre en œuvre.

L'invention concerne un procédé de détermination d'une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce, caractérisé en ce que :

30 a) on dispose d'une fraction nucléaire obtenue à partir dudit échantillon,

b) on dispose d'au moins un réactif spécifique à l'espèce animale, choisi dans le groupe constitué par

- les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232, Nos 242 à
35 261,

14

- 5 - les séquences complémentaires à chacune des séquences
SED ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à 261, respectivement, la
complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de
s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C et
préférentiellement entre 35 et 65°C en solution saline à une
concentration d'environ 0,5 à 1M et préférentiellement 0,8 à 1M
avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 , Nos
242 à 261- les séquences homologues à chacune des séquences
SEQ ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à 261 et des séquences
10 complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 ,
Nos 242 à 261 respectivement, l'homologie s'entendant de toute
séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins
5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites
séquences, et présentant au moins 70% d'identité avec ladite
15 quelconque séquence.
- c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et
d) par détection on détermine tout signal ou information résultant
de la réaction spécifique entre ledit réactif et la fraction nucléique,
caractérisant la présence dans ledit échantillon de ladite espèce
20 animale d'origine.

Elle concerne en outre un procédé tel que décrit précédemment,
caractérisé en ce qu'on dispose d'un ensemble comprenant une multiplicité
desdits réactifs spécifiques à une même espèce d'origine et/ou à des espèces
25 animales d'origine respectivement différentes ; et on détermine une multiplicité
de signaux ou informations caractérisant la présence dans ledit échantillon
d'une même espèce animale d'origine ou de plusieurs espèces animales
d'origine respectivement différentes.

Elle concerne également toute séquence nucléotidique
30 caractérisée en ce qu'elle est choisie dans le groupe constitué par :

- a) les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à
261,
b) les séquences complémentaires à chacune des séquences
SED ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à 261 respectivement, la
complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de
35 s'hybrider une température comprise entre 20 et 70°C et

préférentiellement entre 35 et 65°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M et préférentiellement 0,8 à 1M avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à 261

- 5 c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à 261 et des séquences selon b) respectivement l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites
- 10 séquences, et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Elle concerne également l'utilisation d'une séquence précédemment définie, pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à

15 partir d'au moins ladite espèce animale.

L'invention concerne un procédé de détermination d'une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce, caractérisé en ce qu'il permet ladite

20 détermination dans un échantillon contenant au moins un autre ingrédient obtenu à partir d'une autre espèce animale et sans connaissance préalable des espèces en présence et en ce que :

- a) on dispose d'une fraction nucléaire obtenue à partir dudit échantillon,
- 25 b) on dispose d'au moins un réactif spécifique à l'espèce animale, choisi dans le groupe constitué par
- les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232, Nos 242 à 261,
 - les séquences complémentaires à chacune des séquences
- 30 SED ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à 261, respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C et préférentiellement entre 35 et 65°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M et préférentiellement 0,8 à 1M
- 35 avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à 261- les séquences homologues à chacune des séquences

SEQ ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à 261 et des séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à 261 respectivement, l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences, et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

5 c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et
d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la réaction spécifique entre ledit réactif et la fraction nucléique, caractérisant la présence dans ledit échantillon de ladite espèce animale d'origine.

10 L'invention peut en outre être une sonde pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant au moins une séquence nucléotidique d'identification précédemment définie.

15 Elle concerne également une amorce pour l'amplification spécifique d'un acide nucléique d'une espèce animale d'origine, comprenant au moins une séquence nucléotidique d'identification précédemment définie.

Un autre mode de réalisation de l'invention est un réactif pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique précédemment définie.

20 Selon l'invention les séquences nucléotidiques ou leurs fragments peuvent être fixés sur un support solide et peuvent constituer une biopuce qui permet la détermination de la multiplicité de signaux ou informations.

25 Le procédé selon l'invention peut être conduit de manière manuelle, semi-automatique ou automatique, permettant la mise en œuvre d'un moyen de détermination de l'espèce animale d'origine de la matière animale contenue dans un échantillon.

30 Cette invention concerne également une méthode de détection utilisant en particulier la technique des biopuces. Cette méthode de détection est spécifique des espèces recherchées grâce à l'utilisation de séquences, dites séquences d'identification de chaque espèce, comme sonde. La rapidité, la sensibilité et la spécificité de cette méthode de détection, permettent de l'appliquer indifféremment à tout milieu. En particulier cette méthode s'applique à tout échantillon de produit alimentaire, comportant de la matière animale

quelque soit son état et les procédés de fabrication et/ou d'élaboration mis en œuvre, en particulier les techniques de cuisson, de déshydratation et/ou de conservation, et à tout échantillon de produit manufacturé susceptible de contenir des extraits animaux, comme par exemple les produits cosmétiques
5 et/ou les produits pharmaceutiques comportant par exemple des gélatines d'origine animale.

Cette détection simultanée en une seule étape de multiples produits d'amplifications spécifiques, est possible grâce à l'utilisation de support solide en particulier sous la forme d'un support solide de dimension
10 réduite où sont fixées une multitude de sondes de capture à des positions prédéterminées, ou « biopuce », ces sondes de capture étant constituées par un jeu de fragments ou de la totalité de séquences nucléotidiques spécifiques dites séquences d'identification des espèces recherchées.

Ces séquences nucléotidiques peuvent également être mises en œuvre dans toutes les techniques d'hybridation connues comme les
15 techniques de dépôt ponctuel sur filtre dites "DOT-BLOT" [Maniatis et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982], les techniques de transfert d'ADN dites "SOUTHERN BLOT" [Southern E. M., J. Mol. Biol., 1975, 98, 503], les techniques de transfert d'ARN dites "NORTHERN BLOT", ou les
20 techniques "SANDWICH" [Dunn A.R. et al., Cell, 1977, 12, 23].

La présente invention concerne également la détermination de groupe d'espèces ou classe d'espèces animales ou taxon. Ces groupes d'espèces ou classes ou taxons son constitués par exemple de classe, comme
25 la classe des mammifères, les oiseaux ou les poissons, voire de sous groupes d'espèces comme une famille d'oiseaux ou de deux sou-groupes réunis comme les oiseaux ou les mammifères.

Cette identification est possible grâce à l'identification de séquences nucléotidiques, appelées séquences signatures, caractéristiques
30 d'une classe, d'un groupe, d'un sous-groupe ou d'un taxon, et correspondant à des régions conservées pour l'ensemble des individus constituant le groupe.

Toute séquence signature spécifique à une classe d'animaux mises en œuvre dans le procédé selon la présente invention présente la caractéristique selon laquelle, d'une part elle a une région nucléique conservée pour pratiquement
35 toutes les espèces animales d'une même classe taxonomique, et d'autre part elle peut être discriminée d'autres séquences répondant à la même définition

que précédemment, dans les conditions usuelles de détermination, définies de manière générique dans les revendications en annexe.

L'invention concerne également un procédé de détermination d'un
5 groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré, caractérisé en ce que :

- a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,
- 10 b) on identifie la ou les séquences nucléotidiques caractéristiques du groupe d'espèces animales à déterminer
- c) on dispose d'au moins un réactif comprenant une séquence identifiée à l'étape b),
- c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et
- 15 d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la présence d'une des séquences précédemment définies, caractérisant la présence dans ledit échantillon d'un groupe d'espèces animales d'origine.

Par exemple, pour la détection de la présence de mammifères on
20 utilisera

1/ la séquence signature M1, correspondant à la séquence SEQ N°235 GACACAACAA CAGC, positions 14685 à 14698 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654). Les bases CAA en positions 14689-14690-14691 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession
25 V00654) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléique correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les mammifères. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléique du groupe de mammifères choisis. La présence de ces trois
30 bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de mammifères dans l'échantillon.

2/ la séquence signature M2, correspondant à la séquence SEQ N°262 positions 14634 à 14648 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654). La base T en positions 14641 (séquence de référence *Bos*
35 *taurus* genbank ; n° accession V00654) est conservée pour l'ensemble du matériel nucléique correspondant aux espèces prédéfinies constituant le

groupe que l'on veut rechercher, ici les mammifères. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe de mammifères choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de

5 déterminer la présence de mammifères dans l'échantillon

3/ la séquence signature M3, correspondant à la séquence SEQ N°263, positions 14771 à 14785 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654). La base A en position 14778 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654) est conservée pour l'ensemble du

10 matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les mammifères. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe de mammifères choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de

15 déterminer la présence de mammifères dans l'échantillon.

L'identification de la présence d'oiseaux est déterminée par les signatures :

1/ O1, correspondant à la séquence SEQ N°236 TCCCTAGCCT TCTC, positions 15073 à 15086 (séquence de référence *Gallus gallus*; genbank n° accession X52392). Les bases CT (positions 15076-15077) sont conservées

20 pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La

25 présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

2/ O2, correspondant à la séquence SEQ N°237 ACACTTGCCG GAAC, positions 15098 à 15111 (séquence de référence *Gallus gallus*; genbank n° accession X52392). Les bases CT ou CA (positions 15101 -15102) sont

30 conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci

35 dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

- 3/ O3, correspondant à la séquence SEQ N°264, positions 15036 à 15050 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392). La base C en position 15043 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392) est conservée pour l'ensemble du matériel nucléaire
- 5 correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux
- 10 dans l'échantillon.
- 4/ O4, correspondant à la séquence SEQ N°265, positions 15069 à 15083 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392). La base C en position 15076 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392) est conservée pour l'ensemble du matériel nucléaire
- 15 correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux
- 20 dans l'échantillon.
- 5/ O5, correspondant à la séquence SEQ N°266, positions 15094 à 15108 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392). La base C en position 15101 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392) est conservée pour l'ensemble du matériel nucléaire
- 25 correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux
- 30 dans l'échantillon.
- 6/ O6, correspondant à la séquence SEQ N°267, positions 15102 à 15116 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392). La base A en position 15109 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392) est conservée pour l'ensemble du matériel nucléaire
- 35 correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 5 positions mutées pour le

reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

- 5 7/ O7, correspondant à la séquence SEQ N°268, positions 15108 à 15122 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392). La base C en position 15115 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392) est conservée pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut
- 10 rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.
- 15 8/ O8, correspondant à la séquence SEQ N°269, positions 15232 à 15246 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392). La base C en position 15239 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392) est conservée pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut
- 20 rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

25

- L'identification de la présence de mammifères et d'oiseaux est déterminée par la signature V, correspondant à la séquence SEQ N°238 ATAGCCACAGCATT, positions 14883 à 14896 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654). Les bases GC (en positions 14886 et
- 30 14887) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux et les mammifères. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux et mammifères choisis. La présence de
- 35 ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de mammifères et d'oiseaux dans l'échantillon.

L'identification de la présence de poissons est déterminée par

- 1/ la signature P1, correspondant à la séquence SEQ N°239 ATAATAACCTCTTT, positions 14713 à 14726 (séquence de référence *Gadus morhua* ; genbank n° accession X99772). Les bases ATA ou ATG (positions
5 14716-14717-14718) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les poissons. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe de poissons choisis. La présence de ces trois
10 bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de poissons dans l'échantillon.
- 2/ la séquence signature P2, correspondant à la séquence SEQ N°270, positions 14512 à 14526 (séquence de référence *Gadus morhua* genbank ; n° accession X99772). La base T en position 14519 (séquence de référence
15 *Gadus morhua* genbank ; n° accession X99772) est conservée pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les poissons. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe de poissons choisis. La
20 présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de poissons dans l'échantillon.
- 3/ la séquence signature P3, correspondant à la séquence SEQ N°271, positions 14710 à 14724 (séquence de référence *Gadus morhua* genbank ; n° accession X99772). La base T en position 14717 (séquence de référence
25 *Gadus morhua* genbank ; n° accession X99772) est conservée pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les poissons. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe de poissons choisis. La
30 présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de poissons dans l'échantillon.

La présente invention concerne donc également une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie dans le groupe constitué
35 par :

- a) les séquences de référence SEQ ID Nos 235 à 239, 262 à 271

b) les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 235 à 239 , 262 à 271 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M avec l'une
5 quelconque des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 , 262 à 271,

c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 , 262 à 271 et des séquences selon b) respectivement l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment, comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une
10 quelconque desdites séquences ainsi qu'un groupe de deux ou trois nucléotides appartenant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré, et ladite séquence présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Elle concerne plus particulièrement les séquences nucléotidiques
15 telles que définies ci-dessus et caractérisées en ce qu'elles sont constituées d'un groupe de 2 à 3 nucléotides compris dans l'une des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 et correspondant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré.

Elle concerne également l'utilisation des séquences définies
20 précédemment, c'est à dire caractérisées en ce qu'elles sont constituées d'un groupe de 2 à 3 nucléotides compris dans l'une des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 et correspondant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré, pour la détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient
25 obtenu à partir d'au moins une espèce animale appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré.

Ces séquences dites séquences signatures sont choisies parmi le groupe constitué par la séquence nucléotidique constituée des bases CAA en positions 14689-14690-14691 de SEQ ID N°235, de la séquence nucléotidique
30 constituée des bases CT en positions 15076-15077 de SEQ ID N°236, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15101-15102 de SEQ ID N°237, de la séquence nucléotidique constituée des bases GC en positions 14886-14887 de SEQ ID N°238, et de la séquence nucléotidique constituée des bases ATA en positions 14713-14726 de SEQ ID N°239.

35 Elle concerne plus particulièrement les séquences nucléotidiques telles que définies ci-dessus et caractérisées en ce qu'elles sont constituées

d'un 1 nucléotide compris dans l'une des séquences SEQ ID Nos 262 à 271 et correspondant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré.

Elle concerne également l'utilisation des séquences définies
5 précédemment, c'est à dire caractérisées en ce qu'elles sont constituées d'un 1 nucléotide compris dans l'une des séquences SEQ ID Nos 262 à 271 et correspondant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré, pour la détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à
10 partir d'au moins une espèce animale appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré.

Ces séquences dites séquences signatures sont choisies parmi le groupe constitué par la séquence nucléotidique constituée de la base T en positions 14641 de SEQ ID N°262, de la séquence nucléotidique constituée de
15 la base A en positions 14778 de SEQ ID N°263, de la séquence nucléotidique constitué de la base C en positions 15043 de SEQ ID N°264, de la séquence nucléotidique constituée de la base C en positions 15076 de SEQ ID N°265, par la séquence nucléotidique constituée de la base C en positions 15101 de SEQ ID N°266, de la séquence nucléotidique constituée de la base A en
20 positions 15109 de SEQ ID N°267, de la séquence nucléotidique constitué de la base C en positions 15115 de SEQ ID N°268, de la séquence nucléotidique constituée de la base C en positions 15239 de SEQ ID N°269, de la séquence nucléotidique constituée de la base T en positions 14519 de SEQ ID N°270, de la séquence nucléotidique constitué de la base T en positions 14717 de SEQ
25 ID N°271.

Elle concerne également un réactif pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique choisie parmi le groupe constitué par les séquences SEQ ID Nos 235 à 239, Nos 262 à 271.

30 Elle concerne également le procédé de détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré, caractérisé en ce que :

a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit
35 échantillon,

b) on dispose d'au moins un réactif comprenant une séquence précédemment définie,

c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et

d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la présence d'une des séquences signatures choisies parmi le groupe constitué par la séquence nucléotidique constituée des bases CAA en positions 14689-14690-14691 de SEQ ID N°235, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15076-15077 de SEQ ID N°236, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15101-15102 de SEQ ID N°237, de la séquence nucléotidique constituée des bases GC en positions 14886-14887 de SEQ ID N°238, et de la séquence nucléotidique constituée des bases ATA ou ATG en positions 14713-14726 de SEQ ID N°239, de la séquence nucléotidique constituée de la base T en positions 14641 de SEQ ID N°262, de la séquence nucléotidique constituée de la base A en positions 14778 de SEQ ID N°263, de la séquence nucléotidique constitué de la base C en positions 15043 de SEQ ID N°264, de la séquence nucléotidique constituée de la base C en positions 15076 de SEQ ID N°265, par la séquence nucléotidique constituée de la base C en positions 15101 de SEQ ID N°266, de la séquence nucléotidique constituée de la base A en position 15109 de SEQ ID N°267, de la séquence nucléotidique constitué de la base C en positions 15115 de SEQ ID N°268, de la séquence nucléotidique constituée de la base C en positions 15239 de SEQ ID N°269, de la séquence nucléotidique constituée de la base T en positions 14519 de SEQ ID N°270, de la séquence nucléotidique constitué de la base T en positions 14717 de SEQ ID N°271 caractérisant la présence dans ledit échantillon d'une classe d'espèces animales ou d'un groupe d'espèces animales d'origine.

Les séquences d'identification peuvent également être mises en œuvre comme amorces spécifiques dans des techniques d'identification par PCR, par mélange de plusieurs amorces choisies parmi les séquences nucléotidiques spécifiques d'une espèce animale en présence d'autres espèces susceptibles d'être présentes dans les milieux à doser, et en ce que

au moins une desdites amorces est choisie parmi le groupe constitué par les séquences SEQ ID Nos : 1 à 232, 242 à 261, et toutes séquences comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque
5 séquence

L'invention concerne également les séquences nucléotidiques, choisies parmi le groupe constitué des séquences SEQ ID N° 240 à SEQ ID N°241 et SEQ ID N° 272 à 276 et leur utilisation comme amorces d'amplification universelles, c'est à dire utilisables pour la détection d'espèces
10 en mélange et suffisamment sensibles vis à vis des différentes espèces pour éviter des résultats erronés dus au masquage de certaines espèces présentes en très faible proportion en raison de trop grande sensibilité vis à vis d'une autre espèce susceptible d'être présente dans une proportion plus importante. Préférentiellement, ces amorces sont utilisées en couple choisies parmi les
15 couples suivants : SEQ ID N°240 et SEQ ID N°241, SEQ ID N°272 et SEQ ID N°273, SEQ ID N°274 et SEQ ID N°275.

Ces amorces sont utilisées pour la mise en œuvre des étapes d'amplification des procédés précédemment décrits, notamment lorsque les échantillons comprennent ou sont susceptibles de contenir du matériel
20 biologique provenant d'espèces appartenant au groupe des vertébrés.

Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif et n'ont aucun caractère limitatif. Ils permettront de mieux comprendre l'invention.

25 Exemple 1 : Détection d'une espèce animale dans un échantillon (tableau 1)

a) Préparation de l'échantillon

Des échantillons provenant de plusieurs espèces animales
30 (mammifères, oiseaux, poissons) ont été utilisés dans cet exemple. Ces échantillons se répartissaient en plusieurs catégories :

- des échantillons de référence (désignés sous le terme « ref » dans le tableau 1) :

ADN de référence de diverses espèces animales : ADN de
35 mammifères (bœuf, chèvre, mouton, porc, lapin, lièvre, renne), ADN d'oiseaux (autruche, poulet, dinde, oie), ADN de poissons (cabillaud, thon albacore, thon

listao, merlu, maquereau espagnol, thonine de l'Atlantique, truite arc-en-ciel, truite de mer, saumon de fontaine)

- des prélèvements tissulaires effectués au laboratoire selon un protocole classique : prélèvement buccal de chèvre, de chat ; souris

5 - des prélèvements alimentaires, dont la composition exacte et l'origine sont connues : blanquette de veau, bœuf Bourguignon, langue de veau en sauce, rôti d'agneau, rôti de porc, cuisse de poulet,

- des échantillons commerciaux (désignés sous le terme « comm » dans le tableau 1), obtenus en grande distribution à base de boeuf
10 (foie de veau, beefsteack, côte de veau, vache à lait, rôti de veau, Parmentier, Bolognaise), de porc (jambon, saucisson, saucisse, porc à la chinoise), d'oiseau (steack d'autruche, poulet rôti, pintade rôti, cuisse de dinde, oie rôtie), de poisson (anguille d'Europe, filet de morue salée, thon albacore en boîte, thon listao en boîte, filet de saumon atlantique, maquereau commun, truite arc-
15 en-ciel, omble chevalier).

Tous les échantillons sont numérotés (E1 à E57), et cette numérotation a été conservée dans les 5 exemples illustrant l'invention.

Chaque échantillon est placé dans un sac type baglight® (Intersciences) puis malaxé jusqu'à homogénéisation dans un malaxeur type
20 BagMixer® (Intersciences).

b) Lyse de 25 mg d'échantillon et purification des ADN totaux

La lyse de l'échantillon et la purification des acides nucléiques est réalisée par l'utilisation du Dneasy™ Tissue Nécessaire (Qiagen, ref 69504)
25 en appliquant le protocole préconisé par Qiagen pour l'extraction et la purification des acides nucléiques de tissus animaux.

c) PCR

Une PCR est réalisée en utilisant le nécessaire Ampli Taq gold de
30 Applied Biosystems suivant le protocole ci dessous. On ajoute à 2µl de la suspension d'ADN total le tampon 10X gold buffer , 3,5mM de MgCl₂, 100µM de dNTPs (deoxyribonucleosides triphosphates), 2U de Taq gold polymérase, 0,4µM des amorces euvertébrés telles que décrites par Bartlett et al en 1992 (Biotechniques vol12n°3 p408.412) :

35 SEQ ID N°233: 5' CCATCCAACA TCTCAGCATG ATGAAA 3'
(séquence CDL)

SEQ ID N°234: 5' **GAAATTAATA CGACTCACTA TAGGGAGACC**
ACACCCCTCA GAATGATATT TGTCCTCA3' (séquence CBHT7, en gras :
promoteur de la polymérase T7), afin d'obtenir 50µl de volume réactionnel
final.

5

Un premier cycle de PCR de 10 minutes est réalisé à 95°C suivi de
35 cycles composés chacun des 3 étapes suivantes : 94°C pendant 45
secondes, 50°C pendant 45 secondes, 72°C pendant 2 minutes. Une
extension finale de 5 minutes à 72°C est ensuite réalisée.

10

d) Vérification de l'amplification

Afin de vérifier l'amplification, 5µl de produit d'amplification (ou
amplicon) sont déposés sur un gel d'agarose 1,5% dans un tampon EDTA-Tris
Borate. Après une migration de 20 minutes à 100 Volts, la bande
d'amplification est visualisée par coloration au Bromure d'Ethidium et par
illumination aux Ultra Violets. L'amplification est positive comme le démontre la
présence d'une bande ayant la taille attendue (350 paires de bases).

e) Identification de l'amplicon sur une puce à ADN (Affymetrix,
Santa Clara)

Une biopuce est synthétisée sur un support solide en verre selon le
procédé décrit dans le brevet US 5,744,305 (Affymetrix, Fodor et al) en
utilisant la stratégie de reséquençage décrite dans la demande WO 95/11995
(Affymax, Chee et al) et selon la méthode décrite par A. Troesch et al. (J. Clin.
Microbiol., 37(1) : 49-55, 1999).

Chaque séquence d'identification comporte 17 bases, avec une
position d'interrogation en 10^{ème} position par rapport à l'extrémité 3' de la
séquence.

L'analyse est effectuée avec le système complet GeneChip® (référence
900228, Affymetrix, Santa Clara, CA) qui comprend le lecteur GeneArray®, la
station fluide GeneChip® et le logiciel d'analyse GeneChip®.

e. 1. Transcription et marquage des amplicons

Grâce à l'amorce antisens CBHT7, tous les produits d'amplification
présentent un promoteur pour la RNA polymérase T7. Ces amplicons vont
alors servir de matrice à une réaction de transcription au cours de laquelle sera
incorporé un ribonucléotide fluorescent.

A partir des 50µl de produit d'amplification positif, un aliquot de 2µl est prélevé et ajouté à un mélange de transcription contenant les composants du nécessaire Megascript T7 (Ambion, ref. 1334) et de fluorescein-12-UTP (Roche, ref. 1427857). Le mélange réactionnel final se fait dans 20µl et la
5 réaction de transcription s'effectue pendant 2 heures à 37°C.

e. 2. Fragmentation des transcripts marqués

Afin d'améliorer les conditions d'hybridation, les transcripts marqués sont fragmentés en fragments d'environ 20 nucléotides. Pour cela, les 20µl de transcripts marqués sont soumis à l'action de l'imidazole (Sigma)
10 30mM et du chlorure de manganèse (Merck) 30mM pendant 30 minutes à 65°C.

e. 3. Hybridation sur la puce à ADN

A partir des 20µl de transcripts marqués et fragmentés, un aliquot de 7µl est prélevé et ajouté à 700µl de tampon d'hybridation (SSPE 6X
15 (Eurobio), DTAB 5mM (Sigma), Bétaine 3M (Acros), antifoam 0,01% (ref A80082, Sigma), et 250 µg/ml d'ADN de sperme de hareng (Gibco). Ce mélange est hybridé sur la puce dans les conditions suivantes: 30 minutes à 40°C. Après lavage, la puce est scannée, puis l'image d'hybridation obtenue est analysée par le logiciel GeneChip® (Affymetrix, Santa Clara, CA).

20 Les spots d'hybridation permettent de reconstituer la séquence de l'amplicon, qui est ensuite comparée aux séquences de références de la puce. La séquence (et donc l'espèce qui lui correspond) qui présente le meilleur pourcentage d'homologie (appelé aussi « base-call », exprimé en %) avec la séquence de l'amplicon est retenue pour l'identification.

e.4. Interprétation des résultats.

25 Seule une partie de la séquence de 350 bases est analysée pour chaque espèce. Elle correspond à tout ou partie des sondes d'identification. Le seuil d'interprétation, c'est à dire le niveau d'identification est fixé à 90% de base-call sur la séquence signature. En dessous de ce seuil, la cible, et donc
30 l'espèce correspondante n'est pas considérée comme identifiée.

f) Résultat

L'ADN extrait de l'échantillon alimentaire donne lieu à un produit d'amplification, puis à une identification sur la puce. Comme présenté dans le tableau 1, les échantillons de référence sont correctement analysés par cette
35 technique, qui permet également la détection d'espèce animale (mammifère, oiseau, poisson) dans des échantillons commerciaux.

Tableau 1 : détection d'une espèce animale dans un échantillon

Espèce animale	Nature de l'échantillon		% base call Séquence signature	Identification sur puce
Bœuf (<i>Bos taurus</i>)	ref	E1: ADN bœuf	<i>Bos taurus</i> 100%	bœuf
		E2: Bourguignon	<i>Bos taurus</i> 100%	bœuf
		E3: langue de veau	<i>Bos taurus</i> 100%	bœuf
		E4: blanquette de veau	<i>Bos taurus</i> 100%	bœuf
	comm	E5: côte de veau	<i>Bos taurus</i> 95%	bœuf
		E6: vache à lait	<i>Bos taurus</i> 100%	bœuf
		E7: rôti de veau	<i>Bos taurus</i> 100%	bœuf
		E8: parmentier	<i>Bos taurus</i> 100%	bœuf
		E9: bolognaise	<i>Bos taurus</i> 100%	bœuf
		E10: beefsteack	<i>Bos taurus</i> 100%	bœuf
		E11: foie de veau	<i>Bos taurus</i> 100%	bœuf
Chèvre (<i>Capra hircus</i>)	ref	E12: ADN chèvre	<i>Capra hircus</i> 100%	chèvre
		E13: Prélèvement buccal	<i>Capra hircus</i> 100%	chèvre
Mouton (<i>Ovis aries</i>)	ref	E14: ADN mouton	<i>Ovis aries</i> 95,5%	mouton
		E15: rôti d'agneau	<i>Ovis aries</i> 100%	mouton
Porc (<i>Sus scrofa</i>)	ref	E16: ADN porc	<i>Sus scrofa</i> 100%	porc
		E17: rôti de porc	<i>Sus scrofa</i> 100%	porc
	comm	E18: jambon	<i>Sus scrofa</i> 100%	porc
		E19: saucisson	<i>Sus scrofa</i> 100%	porc
		E20: saucisse	<i>Sus scrofa</i> 100%	porc
		E21: porc à la chinoise	<i>Sus scrofa</i> 100%	porc
Lapin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	ref	E22: ADN lapin	<i>Oryctolagus cuniculus</i> 100%	lapin
Lièvre (<i>Lepus cuniculus</i>)	ref	E22: ADN lièvre	<i>Lepus cuniculus</i> 100%	lièvre
Renne (<i>Rangifer tarandus</i>)	ref	E23: ADN renne	<i>Rangifer tarandus</i> 100%	Renne
Souris (<i>Mus musculus</i>)	ref	E24: souris	<i>Mus musculus</i> 100%	souris
Chat (<i>Felis catus</i>)	ref	E25: Prélèvement buccal	<i>Felis catus</i> 100%	chat
Autruche (<i>Struthio camelus</i>)	ref	E26: ADN autruche	<i>Struthio camelus</i> 100%	Autruche
	comm	E27: steak d'autruche	<i>Struthio camelus</i> 100%	Autruche
Poulet (<i>Gallus gallus</i>)	ref	E28: ADN poulet	<i>Gallus gallus</i> 100%	poulet
		E29: cuisse de poulet	<i>Gallus gallus</i> 94,7%	poulet
	comm	E30: poulet rôti	<i>Gallus gallus</i> 100%	poulet
Pintade (<i>Numida meleagris</i>)	comm	E31: Pintade rôtie	<i>Numida meleagris</i> 100%	Pintade
Dinde (<i>Meleagris gallopavo</i>)	ref	E32: ADN dinde	<i>Meleagris gallopavo</i> 100%	dinde
		E33: rôti de dinde	<i>Meleagris gallopavo</i> 100%	dinde
	comm	E34: cuisses de dinde	<i>Meleagris gallopavo</i> 100%	dinde
Oie (<i>Anser anser</i>)	ref	E35: ADN oie	<i>Anser anser</i> 100%	oie
	comm	E36: oie rôtie	<i>Anser anser</i> 100%	oie
Anguille d'Europe (<i>Anguilla anguilla</i>)	comm	E37: poisson entier	<i>Anguilla anguilla</i> 100%	Anguille d'Europe
Cabillaud (<i>Gadus morhua</i>)	ref	E38: ADN cabillaud	<i>Gadus morhua</i> 100%	Cabillaud
	comm	E39: filet de morue salée	<i>Gadus morhua</i> 100%	Cabillaud
Thon albacore (<i>Thunnus albacares</i>)	ref	E40: ADN thon albacore	<i>Thunnus</i> 100%	thon
	comm	E41: thon albacore en boîte	<i>Thunnus</i> 100%	thon
Thon listao (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	ref	E42: ADN thon listao	<i>Thunnus</i> 94,7%	thon
	comm	E43: thon listao en boîte	<i>Thunnus</i> 94,7%	thon
Saumon d'atlantique (<i>Salmo salar</i>)	comm	E44: filet de saumon d'atlantique	<i>Salmo salar</i> 100%	saumon d'atlantique
Merlu (<i>Merluccius merluccius</i>)	ref	E45: ADN merlu	<i>Merluccius</i> 94,4%	Merlu
Maquereau espagnol (<i>Scomber japonicus</i>)	ref	E46: ADN maquereau espagnol	<i>Scomber japonicus</i> 100%	Maquereau espagnol
Maquereau commun (<i>Scomber scombrus</i>)	comm	E47: poisson entier	<i>Scomber scombrus</i> 100%	Maquereau commun
Thonine de l'atlantique (<i>Euthynnus alletteratus</i>)	ref	E48: ADN thonine atlantique	<i>Euthynnus alletteratus</i> 100%	Thonine de l'atlantique
Truite arc en ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	ref	E49: ADN truite arc en ciel	<i>Oncorhynchus mykiss</i> 100%	Truite arc en ciel
	comm	E50: poisson entier	<i>Oncorhynchus mykiss</i> 100%	Truite arc en ciel
Truite de mer (<i>Salmo trutta fario</i>)	ref	E51: ADN truite de mer	<i>Salmo trutta fario</i> 100%	Truite de mer
Saumon de fontaine (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	ref	E52: ADN saumon de fontaine	<i>Salvelinus fontinalis</i> 100%	Saumon de fontaine
Omble chevalier (<i>Salvelinus alpinus</i>)	comm	E53: poisson entier	<i>Salvelinus alpinus</i> 100%	Omble chevalier

Exemple 2 : Détection de plusieurs d'espèces animales dans un échantillon (tableau 2)

- 5 Les conditions expérimentales concernant la préparation des échantillons, la lyse des échantillons et la purification des ADN totaux, la PCR, la vérification de l'amplification et l'identification de l'amplicon sur une puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara) sont identiques à ce qui est décrit dans l'exemple 1.
- 10 Dans cet exemple, plusieurs espèces animales sont simultanément analysées à partir d'un même échantillon. L'analyse est réalisée sur :
- des échantillons de référence (désignés « ref », comme dans l'exemple 1) constitués par :
 - un mélange d'ADN provenant de deux espèces d'animaux
 - 15 différentes, en proportion variable de chacune des 2 espèces
 - un mélange d'amplicons (obtenus selon le protocole de l'exemple 1), en proportion variable de chacune des deux espèces,
 - des échantillons commerciaux (désignés « comm », comme dans l'exemple 1), issus de la grande distribution, comprenant plusieurs espèces
 - 20 animales dans un même échantillon.
- Comme présentés dans le tableau 2, ces résultats montrent que des mélanges d'espèces peuvent être détectées simultanément dans un même échantillon, que cet échantillon soit constitué d'un mélange d'ADN, d'un mélange d'amplicons ou d'un échantillon commercial comprenant plusieurs
- 25 espèces.

Tableau 2 : détection de plusieurs espèces animales dans un échantillon

Echantillon	Composition	% base call - séquence signature	Identification puce
1) mélange d'amplicons (après amplification)			
Bœuf (E1) + dinde (E32)	80% v/v 20% v/v	Bos taurus 100% Meleagris gallopovo 94,1%	boeuf et dinde
Bœuf (E1) + dinde (E32)	50% v/v 50% v/v	Bos taurus 100% Meleagris gallopovo 100%	boeuf et dinde
Bœuf (E1) + dinde (E32)	20% v/v 80% v/v	Bos taurus 100% Meleagris gallopovo 100%	boeuf et dinde
2) mélanges d'ADN (avant amplification)			
Porc (E16) + lapin (E22)	50% v/v 50% v/v	oryctolagus cuniculus 100% Sus scrofa 94,7%	porc et lapin
Poulet (E22) + dinde (E32)	50% v/v 50% v/v	Gallus gallus 100% Meleagris gallopovo 100%	poulet et dinde
Boeuf (E1) + dinde (E32)	99,9% v/v 0,1% v/v	Bos taurus 100% Meleagris gallopovo 17,6%	boeuf
Boeuf (E1) + dinde (E32)	99% v/v 1% v/v	Bos taurus 100% Meleagris gallopovo 95,1%	boeuf et dinde
Boeuf (E1) + dinde (E32)	90% v/v 10% v/v	Bos taurus 100% Meleagris gallopovo 100%	boeuf et dinde
Boeuf (E1) + dinde (E32)	50% v/v 50% v/v	Bos taurus 100% Meleagris gallopovo 100%	boeuf et dinde
Boeuf (E1) + dinde (E32)	1% v/v 99% v/v	Bos taurus 100% Meleagris gallopovo 100%	boeuf et dinde
Boeuf (E1) + dinde (E32)	0,1% v/v 99,9% v/v	Bos taurus 91% Meleagris gallopovo 95,1%	dinde
Boeuf (E1) + mouton (E14)	5% v/v 95% v/v	Bos taurus 96,5% Ovis aries 81,1%	Boeuf et mouton
Porc (E16) + poulet (E22) + dinde (E32)	33% v/v 33% v/v 33% v/v	Sus scrofa 96,5% gallus gallus 95,6% Meleagris gallopavo 88,9%	Porc, poulet et dinde
3) Produits commerciaux			
Pâté (E54)	porc +volaille	Sus scrofa 100% Meleagris gallopovo 94,1%	porc et dinde
boudin blanc (E55)	porc + volaille	Sus scrofa 100% Meleagris gallopovo 94,1%	porc et dinde
kebab burger (E56)	boeuf + mouton + chevre	Bos taurus 100% Capra hircus 94,1% Ovis aries 81,2%	boeuf, chevre et mouton
Ravioli bolognaise (E57)	porc + boeuf	Sus scrofa 100% Bos taurus 95,8%	boeuf et porc
fromage au saumon (E58)	fromage vache + saumon	Bos taurus 100% Salmo salar 100%	boeuf et saumon
Chipolata volaille (E59)	Volaille	Gallus gallus 95% Meleagris gallopavo 88%	dinde et poulet
Torti et fricadelles (E60)	porc + volaille	Sus scrofa 100% gallus gallus 96,5%	porc et poulet

Exemple 3: Détection d'une ou plusieurs espèces animales dans les farines destinées à l'alimentation animale.

a) Préparation de l'échantillon

5 Les conditions expérimentales concernant la préparation des échantillons sont similaires à ce qui est décrit dans l'exemple 1. Les échantillons sont issus de farines destinées à l'alimentation animale. Ces échantillons (numérotés de F1 à F17) ont été préalablement répertoriés selon 4 catégories, après analyse de la présence de fragments d'os telle que décrite
10 par Michard (Revue de l'Alimentation animale, vol. 508, pp 43-48, 1997 ; technique de référence).

On distingue alors des échantillons « négatifs » lorsque le nombre de fragments d'os est inférieurs à 20, des échantillons « traces » lorsqu'il y a plus de 20 fragments d'os mais une proportion en os présents dans
15 l'échantillon, inférieure à 0,01%, des échantillons « à suivre » lorsque la proportion est comprise entre 0,01% et 1⁰/100, et les échantillons « positifs » lorsque la proportion est supérieure à 1⁰/100.

b) Lyse de l'échantillon et purification des ADN totaux

Pour la lyse de l'échantillon et la purification des acides nucléiques,
20 on utilise le DneasyTM Tissue Nécessaire (Qiagen, ref 69504) tel que décrit dans l'exemple 1, à partir de 25 mg de farine. Une adaptation de la technique est réalisée afin d'éliminer les inhibiteurs de la PCR. En effet, ces inhibiteurs (polyphénols, cations (Ca²⁺, Fe³⁺), traces de métaux lourds, tanins, carbohydrates, sels (NaCl, nitrites)) sont en quantité importante dans les
25 végétaux, et de ce fait dans les farines destinées à l'alimentation animale. Cette adaptation est la suivante :

1- Après la lyse avec le tampon ATL et la protéinase K, du chelex est ajouté lors de l'étape de purification de l'ADN (200µl de InstaGeneTM Matrix (BIO-RAD, ref 732-6030).

30 2- Après incubation de 30 minutes à 56°C, une centrifugation (5 minutes ; 14000 tours/minutes) est réalisée, et l'extraction est réalisée telle que décrite dans le manuel DneasyTM Tissue Nécessaire de Qiagen.

c) PCR

On effectue une PCR en utilisant le nécessaire Ampli Taq gold de
35 Applied Biosystems. On ajoute à 10µl de la suspension d'ADN total extrait de farines le tampon 10X gold buffer, 3,5mM de MgCl₂, 100 µM de dNTPs

(déoxyribonucleosides triphosphates), 2U de Taq gold polymérase, 0,4µM des amorces euvertébrés CBL et CBHT7 telles que définies dans l'exemple 1 afin d'obtenir 50µl de volume réactionnel final. On réalise un premier cycle de 10 minutes à 95°C de PCR puis 35 cycles composés chacun des 3 étapes suivantes : 94°C 45 sec, 50°C 45 sec, 72°C 2 minutes. Une extension finale de 5 minutes à 72°C est ensuite réalisée.

d) Vérification de l'amplification

La vérification de l'amplification est réalisée comme décrit dans l'exemple 1.

10 e) Identification de l'amplicon sur une puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara).

Cette étape d'identification est réalisée telle que décrite dans l'exemple 1.

f) Résultat

15 Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3, et comparés aux résultats obtenus par le protocole classique de l'art antérieur. Il y a parfaite concordance entre les 2 techniques, mais avec, en plus, l'indication de l'espèce dans le cas de l'invention. L'invention permet de détecter la présence d'une ou plusieurs espèces animales dans des échantillons de
20 farines destinées à l'alimentation animale.

Tableau 3 : détection d'une ou plusieurs espèces animales dans les farines destinées à l'alimentation animale.

	Protocole classique		Protocole selon l'invention
	Catégorie	Fragments os	
F1	Négatif	<20 fragments	Aucune espèce détectée
F2	Négatif	<20 fragments	Aucune espèce détectée
F3	Négatif	<20 fragments	Aucune espèce détectée
F4	Négatif	<20 fragments	Aucune espèce détectée
F5	Traces	<0,01%	Aucune espèce détectée
F6	Traces	<0,01%	Aucune espèce détectée
F7	Traces	<0,01%	Porc
F8	Traces	<0,01%	Aucune espèce détectée
F9	Traces	<0,01%	Porc, Souris, Bœuf,
F10	A suivre	0,05%	Porc, Bœuf
F11	A suivre	0,03%	Porc, Bœuf
F12	A suivre	0,02%	Porc, Rat, Bœuf
F13	A suivre	0,01%	Porc
F14	Positif	0,23%	Porc, Bœuf
F15	Positif	0,23%	Bœuf, Porc
F16	Positif	4,70%	Bœuf, Porc, Souris, Dinde
F17	Positif	3,50%	Bœuf, Souris, Porc, Poulet

5

Exemple 4 : détection de la classe des d'espèces contenues dans un échantillon (tableau 4)

L'objectif de cet exemple est d'obtenir une technique permettant de
 10 détecter la classe de vertébrés (mammifères, oiseaux, poissons...) de l'animal
 d'origine de l'ingrédient contenu dans un échantillon alimentaire ou un
 échantillon de farine destinée à l'alimentation animale.

Les conditions expérimentales concernant a) la préparation de
 l'échantillon, b) la lyse de l'échantillon et la purification des ADN totaux, c) la
 15 PCR, d) la vérification de l'amplification et e) l'identification de l'amplicon sur

une puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara) sont similaires à ce qui est décrit dans l'exemple 1 et 3.

L'identification de la présence de mammifère et/ou poisson et/ou d'oiseaux est déterminée par la présence de signatures spécifiques à chaque
5 classe.

Par exemple, pour la détection de la présence de mammifères on utilisera la séquence signature M1, correspondant à la séquence SEQ N°235 GACACAACAA CAGC, positions 14685 à 14698 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654). Les bases CAA en positions 14689-
10 14690-14691 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les mammifères. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le
15 matériel nucléaire du groupe de mammifères choisis. La présence de ces trois bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de mammifères dans l'échantillon.

L'identification de la présence d'oiseaux est déterminée par les signatures :

20 O1, correspondant à la séquence SEQ N°236 TCCCTAGCCT TCTC, positions 15073 à 15086 (séquence de référence *Gallus gallus*; genbank n° accession X52392). Les bases CT (positions 15076-15077) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On
25 observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

O2, correspondant à la séquence SEQ N°237 ACACTTGCCG
30 GAAC, positions 15098 à 15111 (séquence de référence *Gallus gallus*; genbank n° accession X52392). Les bases CT ou CA (positions 15101 -15102) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature
35 citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de ces deux bases aux positions

indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

L'identification de la présence de mammifères et d'oiseaux est déterminée par la signature V1, correspondant à la séquence SEQ N°238
5 ATAGCCACAGCATT, positions 14883 à 14896 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654). Les bases **GC** (en positions 14886 et 14887) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les mammifères et les oiseaux. On observe au plus 4 positions mutées pour le
10 reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe de mammifères et d'oiseaux choisis. La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de mammifères et d'oiseaux dans l'échantillon.

L'identification de la présence de poissons est déterminée par la
15 signature P1, correspondant à la séquence SEQ N°239 ATAATAACCTCTTT, positions 14713 à 14726 (séquence de référence *Gadus morhua* ; genbank n° accession X99772). Les bases **ATA** ou **ATG** (positions 14716-14717-14718) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les
20 poissons. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe poissons choisis. La présence de ces trois bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de poissons dans l'échantillon.

25 Comme présenté dans le tableau 4, cette technique permet de détecter la présence de mammifères et/ou d'oiseaux et/ou de poissons, que ces espèces soient présentes isolément ou en mélange.

Tableau 4a : détection de classe d'espèces dans un échantillon

Echantillons	Signatures détectées	interprétation
E1 : ADN boeuf	V1 et M1	mammifère
E16 : ADN porc	V1 et M1	mammifère
E17 : rôti de porc	V1 et M1	mammifère
E12 : ADN chèvre	V1 et M1	mammifère
E13 : chèvre prélèvement buccal	V1 et M1	mammifère
E35 : ADN oie	V1 et O1 et O2	oiseau
E49 : ADN truite arc en ciel	P1	poisson
E51 : ADN truite de mer	P1	poisson
Mélange amplicons boeuf / dinde	V1 et M1 et O1 et O2	mammifère / oiseau
E15 : rôti d'agneau	V1 et M1	mammifère
F9 : farine « trace »	V1 et M1	mammifère
F1 : farine « négatif »	Pas de signatures positive	pas d'identification
farine	P1	poisson

5

Une variante consiste à sélectionner non pas un triplet de nucléotides, mais un seul nucléotide représentatif d'une classe d'espèces donnée.

Par exemple, pour la détection de la présence de mammifères, on utilisera indifféremment

- 10 1/ la séquence signature M2, correspondant à la séquence SEQ N°262 CTAATCCTACAAATC positions 14634 à 14648 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654). La base T en positions 14641 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654) est
- 15 pré-définies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les mammifères. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour

l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe de mammifères choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de mammifères dans l'échantillon

- 5 2/ la séquence signature M3, correspondant à la séquence SEQ N°263
AGCTTCAATGTTTTT, positions 14771 à 14785 (séquence de référence *Bos*
taurus genbank ; n° accession V00654). La base A en position 14778
(séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654) est
conservée pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces
10 prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les mammifères.
On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour
l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe de
mammifères choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci
dessus permet ainsi de déterminer la présence de mammifères dans
15 l'échantillon.

Pour la détection d'oiseaux, on peut utiliser indifféremment

- 1/ la séquence signature O3, correspondant à la séquence SEQ N°264
CGGCCTACTACTAGC, positions 15036 à 15050 (séquence de référence
20 *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392). La base C en position 15043
(séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392) est
conservée pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces
prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On
observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour
25 l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe
d'oiseaux choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci dessus
permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

- 2/ la séquence signature O4, correspondant à la séquence SEQ N°265
CACATCCCTAGCCTT, positions 15069 à 15083 (séquence de référence
30 *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392). La base C en position 15076
(séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392) est
conservée pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces
prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On
observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour
35 l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe

d'oiseaux choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

3/ la séquence signature O5, correspondant à la séquence SEQ N°266 GCCCACA~~CTTG~~CCGG, positions 15094 à 15108 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392). La base C en position 15101 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392) est conservée pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

4/ la séquence signature O6, correspondant à la séquence SEQ N°267 TTGCCGGAACGTACA, positions 15102 à 15116 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392). La base A en position 15109 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392) est conservée pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

5/ la séquence signature O7, correspondant à la séquence SEQ N°268 GAACGTACAATACGG, positions 15108 à 15122 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392). La base C en position 15115 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392) est conservée pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

6/ la séquence signature O8, correspondant à la séquence SEQ N°269 TGAAACACAGGAGTA, positions 15232 à 15246 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392). La base C en position 15239 (séquence de référence *Gallus gallus* genbank ; n° accession X52392) est

conservée pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

Pour la détection de poissons, on peut utiliser indifféremment

1/ la séquence signature P2, correspondant à la séquence SEQ N°270
10 TCAGACATCGAGACA, positions 14512 à 14526 (séquence de référence *Gadus morhua* genbank ; n° accession X99772). La base T en position 14519 (séquence de référence *Gadus morhua* genbank ; n° accession X99772) est conservée pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les poissons. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe de poissons choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de poissons dans l'échantillon.

2/ la séquence signature P3, correspondant à la séquence SEQ N°271
20 GTAATAATAACCTCT, positions 14710 à 14724 (séquence de référence *Gadus morhua* genbank ; n° accession X99772). La base T en position 14717 (séquence de référence *Gadus morhua* genbank ; n° accession X99772) est conservée pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les poissons. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe de poissons choisis. La présence de cette base à la position indiquée ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de poissons dans l'échantillon.

30 Comme présenté dans le tableau 4b, cette technique permet de détecter la présence de mammifères et/ou d'oiseaux et/ou de poissons dans un échantillon notamment alimentaire.

Tableau 4b : détection de classe d'espèces dans un échantillon

Echantillons	Signatures détectées	interprétation
Paté de foie de porc	M3	Mammifères
Boeuf	M4	Mammifères
Poulet	O3 et O4 et O5 et O6	Oiseaux
Paella de poulet	O3 et O4 et O5 et O6 et O7	Oiseaux
Maquereau espagnol	P2	Poisson
Sardine en boîte	P3	Poisson
Farine de poissons	P2	Poisson
Farine de poissons	P3	Poisson
Pintade frais	O1,O2,O3,O4,O5, O6,O7 et O8	Oiseaux

5

Exemple 5 : amorces universelles d'amplification des vertébrés (tableau 5a et 5b)

10 L'objectif des expériences présentées dans cet exemple est d'obtenir des amorces encore plus sensibles que celles décrites dans les exemples précédents, et plus universelles pour la détection des espèces en mélanges. En effet, les amorces utilisées dans les exemples 1 à 4 sont très sensibles vis à vis du bœuf, ce qui peut masquer parfois la présence d'autres
15 espèces lorsque elles sont présentes en très faible proportion.

Plusieurs couples d'amorces ont été utilisés dans cet exemple :

Un premier couple d'amorces comprenant les séquences suivantes

SEQ ID N°240: 5' GACCTCCAG CCCCATCAA 3' (séquence CBL 20) et

20 SEQ ID N°241: 5' GAAATTAATA CGACTACTA TAGGGAGACC ACACAGAATG ATATTGTCC TCA 3' (séquence CBHT7 20, avec en gras, la

localisation du promoteur de la polymérase T7) a été choisi dans un premier temps pour augmenter le seuil de détection de certaines espèces, notamment la dinde, ou le mouton, qui lorsqu'elles sont à l'état de trace dans un échantillon commercial, peuvent être masquées par la présence de boeuf.

5 La technique utilisée pour obtenir l'identification sur la puce est telle que décrite dans l'exemple 1a, 1b,1c (avec les amorces modifiées), 1d, 1e.

 Comme présenté dans le tableau 5a, l'utilisation de ces nouvelles amorces permettent d'obtenir, chez la dinde, un seuil de détection de l'ordre de
10 1% par comparaison avec les amorces des exemples 1 à 4 où le seuil de détection était de l'ordre de 10%. L'utilisation de ces nouvelles amorces permettent également, dans des échantillons commerciaux, provenant de la grande distribution, l'identification d'espèces animales, notamment le mouton, présentes à l'état de trace, qui étaient masquées par la présence de bœuf
15 dans les exemples précédents (tableau 5b).

Tableau 5 a : seuil de détection de la dinde en mélange avec du boeuf

Détection sur puce: % base call					
% ADN		Amorces ex 1 à 4		Amorces ex 5	
E1 : boeuf	E32 : dinde	boeuf	dinde	boeuf	dinde
100	0	100	5,9	100	29,4
99,9	0,1	100	17,6	100	41,2
99	1	100	76,5	100	94,1
90	10	100	100	100	100
50	50	100	100	100	100
1	99	100	100	90	100
0,1	99,9	100	100	60	100
0	100	50	94,1	26,9	100
Seuil de détection		0,10%	10%	1%	1%

5 *Tableau 5b : détection du mouton en mélange avec d'autres espèces*

Produits commerciaux	composition indiquée	détection sur puce : espèces détectées	
		amorces ex 1 à 4	amorces ex 5
E56 : Kebab Burger	Pain, viande hachée précuite (mouton, boeuf), sauce	Boeuf,	Boeuf Mouton
E57 : Boulette couscous	Boeuf, mouton, végétaux	Boeuf	Boeuf Mouton

Dans un deuxième temps, un deuxième couple d'amorces a été choisi et utilisé en duplex avec le couple d'amorces décrit dans l'exemple 1 c : lors de la

10 détection d'espèces animales présentes initialement dans une boîte de conserve, on peut être confronté à un problème de dégradation de l'ADN des espèces animales que l'on souhaite détecter, notamment lors de boîte de conserve de poissons (par exemple le thon en boîte).

La technique utilisée pour obtenir l'identification sur la puce est telle que décrite dans l'exemple 1a, 1b, 1d, 1e à l'exception de l'étape 1c : on utilise 2 amorces internes supplémentaires (en plus de celles universelles) qui permettent d'amplifier la région de 350 pb en deux parties plus petites.

- 5 Plusieurs couples d'amorces sont étudiées, permettant d'amplifier la région de 350 pb en deux régions de longueur comprise entre 114 et 245 pb chacune, selon les amorces utilisées. Deux couples d'amorces ont alors été sélectionnées pour leur caractère universel.

Un premier couple d'amorces (utilisé en duplex 1) comprenant les séquences
10 suivantes

SEQ ID N° 272 : 5' AGAIGCICCGTTTGCGTG 3' (flanqué du promoteur de la polymérase T7 et I= Inosine))

SEQ ID N° 273:TTCTTCTTTATCTGTITCTA (I= Inosine)

- a été choisi dans un premier temps pour augmenter le seuil de détection de
15 certaines espèces de poissons, en particulier lorsque ces espèces de poissons sont présentes dans une boîte de conserve.

Un deuxième couple d'amorces (utilisé en duplex 2), comprenant les séquences suivantes, a également été sélectionné :

- SEQ ID N° 274 : 5' RTCICGRCARATGTG 3' (flanqué du promoteur de la
20 polymérase T7 et R= A ou G, I= Inosine)

SEQ ID N° 275 : 5' GTIAAYTWYGGITGACTIATCCG 3' (M= A ou C, R= A ou G, Y= C ou T, W= A ou T, I= Inosine)

- D'un façon comparable à ce qui est décrit dans l'exemple 1c, on
25 effectue une PCR en utilisant le kit Ampli Taq gold de Applied Biosystems (4311814) On ajoute à 2µl de la suspension d'ADN total le tampon 10Xgold buffer, 3.5mM de Mgcl2, 100µM de dNTPs (déoxyribonucleosides triphosphates), 2U de Taq gold polymérase, 0.2µM des amorces universels pour vertébrés CBL et CBHT7 tel que présentées dans l'exemple 1c, et 0.2µM
30 des amorces choisies parmi les couples d'amorces définies ci dessus (duplex 1 et duplex 2), afin d'obtenir 50µl de volume réactionnel final. On réalise un premier cycle de 10mn à 95°C de PCR puis 35 cycles composés chacun des 3 étapes suivantes : 94°C 45 sec, 50°C 45 sec, 72°C 2mn. Une extension finale de 5mn à 72°C est ensuite réalisée.

- 35 Une vérification de l'amplification est réalisée en déposant 5µl de produit d'amplification (amplicon) sur un gel d'agarose 1,5% dans de l'EDTA-

Tris Borate. Après une migration de 20mn à 100V, on visualise deux bandes d'amplification par coloration au Bromure d'Ethidium et par illumination aux UV.

Les résultats obtenus par l'utilisation de chaque duplex est
5 présenté dans le tableau 5c, et comparés aux résultats obtenus par une amplification « classique », en utilisant uniquement les amorces universelles telles que décrites dans l'exemple 1c.

10 *Tableau 5c : détection de plusieurs espèces de poissons dans un échantillon (issus d'une boîte de conserve)*

Echantillon	% Base call – Séquence signature		
	Duplex 1	Duplex 2	Simplex selon ex 1
Conserve thon blanc (<i>Thunnus alalunga</i>)	100 %	100 %	89,2 %
Conserve saumon de l'atlantique (<i>Salmo salar</i>)	90 %	95 %	93 %
Conserves miettes de thon alcabore (<i>Thunnus albacares</i>)	89,5 %	94,7 %	Pas d'amplification

Il apparaît que les amorces utilisés en duplex 1 et 2 présentent de
meilleurs résultats et une meilleur sensibilité lorsque 'lon souhaite detecter la
15 présence de poissons notamment dans une boîte de conserve.
Il est bien évident que chaque amorce peut être utilisée avec ou sans le promoteur T7.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détermination d'une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce, caractérisé en ce que :

a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,

b) on dispose d'au moins un réactif spécifique à l'espèce animale, choisi dans le groupe constitué par

10 - les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232, Nos 242 à 261,

15 - les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à 261 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M, avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à 261,

20 - les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à 261 et des séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à 261 respectivement, l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences, et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

25 c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et

30 d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la réaction spécifique entre ledit réactif et la fraction nucléique, caractérisant la présence dans ledit échantillon de ladite espèce animale d'origine.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on dispose d'un ensemble comprenant une multiplicité desdits réactifs spécifiques à une même espèce d'origine et/ou à des espèces animales d'origine respectivement différentes ; et on détermine une multiplicité de signaux ou informations caractérisant la présence dans ledit échantillon d'une même

espèce animale d'origine et/ou de plusieurs espèces animales d'origine respectivement différentes.

3. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie dans le groupe constitué par :

- 5 a) les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à 261,
- b) les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à 261 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M, avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à 261,
- 10 c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 , Nos 242 à 261 et des séquences selon b) respectivement,
- 15 l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

20 4. Utilisation d'une séquence selon la revendication 3, pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce animale.

25 5. Sonde pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant au moins une séquence nucléotidique d'identification selon la revendication 3.

30 6. Amorce pour l'amplification spécifique d'un acide nucléique d'une espèce animale d'origine, comprenant au moins une séquence nucléotidique d'identification selon la revendication 3.

35 7. Réactif pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique selon la revendication 3.

8. Biopuce comprenant un support solide comportant une surface développée, sur laquelle est disposée et fixée une multiplicité de séquences nucléotidiques selon la revendication 3, et ceci selon un arrangement prédéterminé.

5

9. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'on détermine la multiplicité de signaux ou informations avec une biopuce selon la revendication 8.

10 10. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie dans le groupe constitué par :

a) les séquences de référence SEQ ID Nos 235 à 239, 262 à 271

b) les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 235 à 239, 262 à 271 respectivement, la complémentarité s'entendant
15 de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 235 à 239, 262 à 271,

c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 235 à 239, 262 à 271 et des séquences selon b) respectivement
20 l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment, comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences ainsi qu'un groupe de deux ou trois nucléotides appartenant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré, et ladite séquence présentant au moins 70% d'identité
25 avec ladite quelconque séquence.

11. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est constituée d'un groupe de 1 à 3 nucléotides compris dans l'une des séquences selon la revendication 10 et correspondant à une région conservée pour
30 l'ensemble des espèces d'un groupe considéré.

12. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases CAA en positions 14689-14690-14691 de SEQ ID N°235 ou des bases CT en positions 15076-15077
35 de SEQ ID N°236 ou des bases CT en positions 15101-15102 de SEQ ID

N°237.ou des bases GC en positions 14886-14887 de SEQ ID N°238.ou des bases ATA en positions 14713-14726 de SEQ ID N°239.

13. Séquence nucléotidique selon la revendication 11,
5 caractérisée en ce qu'elle est constituée de la base T en positions 14641 de SEQ ID N°262, ou de la base A en positions 14778 de SEQ ID N°263, ou de la base C en positions 15043 de SEQ ID N°264, ou de la base C en positions 15076 de SEQ ID N°265, ou de la base C en positions 15101 de SEQ ID N°266, ou de la base A en position 15109 de SEQ ID N°267, ou de la base C
10 en positions 15115 de SEQ ID N°268, ou de la base C en positions 15239 de SEQ ID N°269, ou de la séquence nucléotidique constituée de la base T en positions 14519 de SEQ ID N°270, ou de la base T en positions 14717 de SEQ ID N°271.

15 14 Réactif pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique selon la revendication 10.

15 15 Procédé de détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré, caractérisé en ce que :

- a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,
- 25 b) on dispose d'au moins un réactif comprenant une séquence selon la revendication 10,
- c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et
- d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la présence d'une des séquences selon l'une quelconque des revendications 11
30 à 13, caractérisant la présence dans ledit échantillon d'un groupe d'espèces animales d'origine.

16 Utilisation des séquences définies dans l'une quelconque des revendications 11 à 13, pour la détermination d'un groupe
35 d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un

ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce animale appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré.

17. Procédé de détermination d'un groupe d'espèces animales
- 5 d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré, caractérisé en ce que :
- a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,
- 10 b) on identifie la ou les séquences nucléotidiques caractéristiques du groupe d'espèces animales à déterminer
- c) on dispose d'au moins un réactif comprenant une séquence identifiée à l'étape b),
- c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et
- 15 d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la présence d'une des séquences selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisant la présence dans ledit échantillon d'un groupe d'espèces animales d'origine.

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> BioMérieux

<120> Procédé de détection et/ou d'identification de l'espèce animale d'origine de la matière animale contenue dans un échantillon.

<130> B05B3851WO/ANIFRAUD

<160> 276

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 18

<212> ADN

<213> Anas platyrhynchos

<400> 1
ctcctactgg ctatgcac

18

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> Anas platyrhynchos

<400> 2
gtaatcctac tgctcactc

19

<210> 3

<211> 38

<212> ADN

<213> Anas platyrhynchos

<400> 3
ttcggatctc tgctcgccat ctgcctggcc acacaaat

38

<210> 4

<211> 24

<212> ADN

<213> Anas platyrhynchos

<400> 4

gacacatccc ttgctttctc ctca

24

<210> 5

<211> 33

<212> ADN

<213> Anser anser

<400> 5

ctcccttcta gccatctgct tagccacac

33

<210> 6

<211> 21

<212> ADN

<213> Anser anser

<400> 6

ccgcagacac ttcactcgcc t

21

<210> 7

<211> 25

<212> ADN

<213> Anser anser

<400> 7

caacggtgct tcgctcttct ttatc

25

<210> 8

<211> 18

<212> ADN

<213> Anser anser

<400> 8
cacttcactc gccttctc

18

<210> 9

<211> 16

<212> ADN

<213> Cairina moschata

<400> 9
aacctgcacg ccaatg

16

<210> 10

<211> 35

<212> ADN

<213> Cairina moschata

<400> 10
gggtccctcc tcgccatttg cctggtcacc caaat

35

<210> 11

<211> 17

<212> ADN

<213> Cairina moschata

<400> 11
gtcctgccat ggggaca

17

<210> 12

<211> 22

<212> ADN

<213> Cairina moschata

<400> 12
ctcctactcg ccctcatggc aa

22

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> Cairina moschata

<400> 13
atccgcaacc tgcacgcaa

20

<210> 14

<211> 24

<212> ADN

<213> Cairina moschata

<400> 14
tcctcagtgga ctaacacatg tcga

24

<210> 15

<211> 17

<212> ADN

<213> Rangifer tarandus

<400> 15
cgagacgtca attatgg

17

<210> 16

<211> 17

<212> ADN

<213> Rangifer tarandus

<400> 16
atctgcttat ttataca

17

<210> 17

<211> 17

<212> ADN

<213> Rangifer tarandus

<400> 17

tcctctgtta ctcacat

17

<210> 18

<211> 17

<212> ADN

<213> Rangifer tarandus

<400> 18

tcctcttatt tacagta

17

<210> 19

<211> 27

<212> ADN

<213> Rangifer tarandus

<400> 19

aattattggag tgatcctctt atttaca

27

<210> 20

<211> 17

<212> ADN

<213> Columba palumbus

<400> 20

acacaggagt cgtcctc

17

<210> 21

<211> 16

<212> ADN

<213> Columba palumbus

<400> 21
ttgctaactc aaatcc

16

<210> 22

<211> 17

<212> ADN

<213> Columba palumbus

<400> 22
acccttatag ccactgc

17

<210> 23

<211> 23

<212> ADN

<213> Columba palumbus

<400> 23
ggcttactac tcgccgcaca tta

23

<210> 24

<211> 17

<212> ADN

<213> Columba palumbus

<400> 24
ctaaccggct tactact

17

<210> 25

<211> 23

<212> ADN

<213> Columba palumbus

<400> 25
ggcatttgct tgctaactca aat

23

<210> 26

<211> 19

<212> ADN

<213> Acipenser baerii

<400> 26
ctcactcata ggcctctgc

19

<210> 27

<211> 17

<212> ADN

<213> Acipenser baerii

<400> 27
tggctcactc ataggcc

17

<210> 28

<211> 17

<212> ADN

<213> Coturnix coturnix

<400> 28
ctgcttctca cactaat

17

<210> 29

<211> 16

<212> ADN

<213> Coturnix coturnix

<400> 29
tcaccggcct tctact

16

<210> 30

<211> 16

<212> ADN

<213> Coturnix coturnix

<400> 30
tagcaatatg cctcat

16

<210> 31

<211> 21

<212> ADN

<213> Sardina pilchardus

<400> 31
cttcggatcg cttcttggcc t

21

<210> 32

<211> 24

<212> ADN

<213> Sardina pilchardus

<400> 32
ctccttcttt tggatcatgat aact

24

<210> 33

<211> 20

<212> ADN

<213> Sardina pilchardus

<400> 33
gggcgagggc tctattatgg

20

<210> 34

<211> 17

<212> ADN

<213> Sardina pilchardus

<400> 34
attgggcgag ggctcta

17

<210> 35

<211> 20

<212> ADN

<213> Sardina pilchardus

<400> 35
gttgctctcc ttcttttggt

20

<210> 36

<211> 16

<212> ADN

<213> Sardina pilchardus

<400> 36
atggagcatc tttttt

16

<210> 37

<211> 17

<212> ADN

<213> Sardina pilchardus

<400> 37
ttggttatgt cttaccg

17

<210> 38

<211> 48

<212> ADN

<213> Sardina pilchardus

<400> 38
tggcctctgt ctagecgccc agattctgac agggttgttc ttagccat

48

<210> 39

<211> 21

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 39
tgattcgaag tatgcacgca a

21

<210> 40

<211> 17

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 40
tttgtattta cgccac

17

<210> 41

<211> 19

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 41
cctctgacat cgcaaccgc

19

<210> 42

<211> 19

<212> ADN

<213> *Anguilla anguilla*

<400> 42
atacctttac atagaaaca

19

<210> 43

<211> 16

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 43

gtgggctatg ttctcc

16

<210> 44

<211> 18

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 44

ttcctattag cagtctgc

18

<210> 45

<211> 19

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 45

tcatccggaa tctccacgc

19

<210> 46

<211> 21

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 46

catctgtatc ttccttcaca t

21

<210> 47

<211> 23

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 47
gtagcccaca cttgccggaa cgt

23

<210> 48

<211> 17

<212> ADN

<213> Scomber japonicus

<400> 48
ggacttttcc tcgcaat

17

<210> 49

<211> 23

<212> ADN

<213> Scomber japonicus

<400> 49
tgcctaattt ctcaaattct cac

23

<210> 50

<211> 20

<212> ADN

<213> Scomber japonicus

<400> 50
ttcggctcac tgcttggtct

20

<210> 51

<211> 20

<212> ADN

<213> Scomber japonicus

<400> 51

cactacaccc ccgatgttga

20

<210> 52

<211> 25

<212> ADN

<213> Scomber japonicus

<400> 52

tcctaccttt tcatggaaac atgaa

25

<210> 53

<211> 36

<212> ADN

<213> Scomber japonicus

<400> 53

acccccgatg ttgagtcagc attcgactca

36

<210> 54

<211> 18

<212> ADN

<213> Anguilla japonica

<400> 54

tatggatgat tcatccga

18

<210> 55

<211> 21

<212> ADN

<213> Anguilla japonica

<400> 55

gatgattcat ccgaaattta c

21

<210> 56

<211> 17

<212> ADN

<213> Anguilla japonica

<400> 56

ataataactg cattcgt

17

<210> 57

<211> 19

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 57

tattatgggt cgtacctat

19

<210> 58

<211> 17

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 58

aacctccatg cgaatgg

17

<210> 59

<211> 26

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 59

gcagacacca ctcttgcatc ctcttc

26

<210> 60

<211> 27

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 60
ttctcttctg tggcctacac atgccga

27

<210> 61

<211> 17

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 61
tgcctcatca ctcaaata

17

<210> 62

<211> 18

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 62
cttaaccggc ctctact

18

<210> 63

<211> 28

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 63
caggagtagt cttacttctc accctcat

28

<210> 64

<211> 18

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 64
ctcatcactc aaatctta

18

<210> 65

<211> 16

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 65

ctcctcgtaa tgatga

16

<210> 66

<211> 17

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 66

ttccttgcaa tgcacta

17

<210> 67

<211> 19

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 67

atgaaacgtc ggtgtagtc

19

<210> 68

<211> 17

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 68

ggtgtagtcc tcctcct

17

<210> 69

<211> 19

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 69

tcatccgcaa catgcacgc

19

<210> 70

<211> 33

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 70

tacacgcccg acgtcgaatc agcattcaac

33

<210> 71

<211> 17

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 71

ggttccctgc ttggtct

17

<210> 72

<211> 17

<212> ADN

<213> Anguilla mossambica

<400> 72

aatggagctt ctttctt

17

<210> 73

<211> 26

<212> ADN

<213> Anguilla mossambica

<400> 73
ggactatgtc ttatctctca aatcct

26

<210> 74

<211> 20

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 74
tatccgctat atgcacgcaa

20

<210> 75

<211> 21

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 75
ggagtatgct tgattctaca g

21

<210> 76

<211> 18

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 76
cggatcctat gtattcat

18

<210> 77

<211> 24

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 77
acattggaat tgtactatta ttcg

24

<210> 78

<211> 16

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 78
actattatttc gcaacc

16

<210> 79

<211> 16

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 79
attatccgct atatgc

16

<210> 80

<211> 16

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 80
cagggtttatt ctttagc

16

<210> 81

<211> 16

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 81
gcaaccatag ccacag

16

<210> 82

<211> 18

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 82

aaatggcgct tccatatt

18

<210> 83

<211> 16

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 83

taggagtatg cttgat

16

<210> 84

<211> 16

<212> ADN

<213> Numida meleagris

<400> 84

gacccaaatt atcacc

16

<210> 85

<211> 19

<212> ADN

<213> Numida meleagris

<400> 85

atccctccta gcagtctgc

19

<210> 86

<211> 16

<212> ADN

<213> Numida meleagris

<400> 86
atgacccaaa ttatca

16

<210> 87

<211> 18

<212> ADN

<213> Numida meleagris

<400> 87
tgtcgaaatg tccaatac

18

<210> 88

<211> 18

<212> ADN

<213> Equus asinus

<400> 88
agacactaca actgcctt

18

<210> 89

<211> 16

<212> ADN

<213> Equus asinus

<400> 89
gctcctacac attcct

16

<210> 90

<211> 17

<212> ADN

<213> Equus asinus

<400> 90
atcagacact acaactg

17

<210> 91

<211> 18

<212> ADN

<213> Equus asinus

<400> 91

tgccctcttta tccacgta

18

<210> 92

<211> 16

<212> ADN

<213> Auxis thazard

<400> 92

ttggcgtagt tcttct

16

<210> 93

<211> 29

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 93

cagatgaatt atccaccatc tccatgcta

29

<210> 94

<211> 23

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 94

atgtgaacta cagatgaatt atc

23

<210> 95

<211> 25

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 95
ttctcctatt tcttcagta atagc

25

<210> 96

<211> 23

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 96
tcctagctat atactacaca tca

23

<210> 97

<211> 25

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 97
gaaatattgg gattctccta tttct

25

<210> 98

<211> 18

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 98
gccttctttg gttccctc

18

<210> 99

<211> 22

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 99
tctcatctgt tatacacatc tg

22

<210> 100

<211> 23

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 100
tcacgtagga caaggccttt act

23

<210> 101

<211> 23

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 101
gcctttacta cagctcctac acc

23

<210> 102

<211> 21

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 102
ctttggttcc cacctaggaa t

21

<210> 103

<211> 16

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 103
tcccacctag gaatct

16

<210> 104

<211> 19

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 104

tgccctcttta ttcacgtag

19

<210> 105

<211> 17

<212> ADN

<213> Euthynnus alletteratus

<400> 105

attggtgtag tacttct

17

<210> 106

<211> 17

<212> ADN

<213> Euthynnus alletteratus

<400> 106

tttgcattta ctcacac

17

<210> 107

<211> 17

<212> ADN

<213> Euthynnus alletteratus

<400> 107

ggcctgttcc tcgcaat

17

<210> 108

<211> 16

<212> ADN

<213> Euthynnus alletteratus

<400> 108
gcatttactc acacat

16

<210> 109

<211> 17

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 109
tatgtattac cctgagg

17

<210> 110

<211> 30

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 110
gacatcgca cggcctttac atccgtagca

30

<210> 111

<211> 16

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 111
ccctcctcgg cctctg

16

<210> 112

<211> 21

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 112

ggcctgtttc tcgctataca c

21

<210> 113

<211> 29

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 113

tctgttttagc tgcccaagtc ctcacaggc

29

<210> 114

<211> 17

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 114

ctcggcctct gtttagc

17

<210> 115

<211> 17

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 115

tcctatctat acaaaga

17

<210> 116

<211> 19

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 116

catcagacat cgcgacggc

19

<210> 117

<211> 16

<212> ADN

<213> Gadus morhua

<400> 117

tgactaattc ggaata

16

<210> 118

<211> 20

<212> ADN

<213> Gadus morhua

<400> 118

catgctaata gtcctcttt

20

<210> 119

<211> 17

<212> ADN

<213> Gadus morhua

<400> 119

ggttcctatc tttttgt

17

<210> 120

<211> 17

<212> ADN

<213> Phasianus colchicus

<400> 120

aaacactgga gtcgtcc

17

<210> 121

<211> 16

<212> ADN

<213> Phasianus colchicus

<400> 121
gaaatgtgca gtacgg

16

<210> 122

<211> 20

<212> ADN

<213> Phasianus colchicus

<400> 122
ggttccctgc tagcagtatg

20

<210> 123

<211> 18

<212> ADN

<213> Phasianus colchicus

<400> 123
actggcctcc tattagcc

18

<210> 124

<211> 17

<212> ADN

<213> Phasianus colchicus

<400> 124
tgccttatta ctcaaatt

17

<210> 125

<211> 18

<212> ADN

<213> Phasianus colchicus

<400> 125
tgtcgaaatg tgcaagtac

18

<210> 126

<211> 17

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 126

accggcggtta tcctcct

17

<210> 127

<211> 20

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 127

tgaaacaccg gcgttatcct

20

<210> 128

<211> 18

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 128

ttttggatcg ctactagg

18

<210> 129

<211> 24

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 129

cagtacggat gatttatccg caat

24

<210> 130

<211> 17

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 130

cacacatgcc ggaacgt

17

<210> 131

<211> 23

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 131

tcctactaac attaatagca act

23

<210> 132

<211> 16

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 132

aattttggat cgctac

16

<210> 133

<211> 20

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 133

ctaacagggc tcctactagc

20

<210> 134

<211> 16

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 134
cacagccgac actaca

16

<210> 135

<211> 18

<212> ADN

<213> Felis catus

<400> 135
ctgtcgcgac gttaatta

18

<210> 136

<211> 23

<212> ADN

<213> Felis catus

<400> 136
cctacacctt ctcagagaca tga

23

<210> 137

<211> 21

<212> ADN

<213> Felis catus

<400> 137
tatctgcctg tacatacatg t

21

<210> 138

<211> 17

<212> ADN

<213> Felis catus

<400> 138
attggaatca tactatt

17

<210> 139

<211> 23

<212> ADN

<213> Felis catus

<400> 139

acagctttta tgggatacgt cct

23

<210> 140

<211> 25

<212> ADN

<213> Felis catus

<400> 140

caccggcctc tttttggcca tacac

25

<210> 141

<211> 25

<212> ADN

<213> Felis catus

<400> 141

ggaatcatad tattatttac agtca

25

<210> 142

<211> 22

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 142

accagacgcc tcaaccgcct tt

22

<210> 143

<211> 23

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 143

tcctcctgct tgcaactata gca

23

<210> 144

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 144

ctcactcctt ggcgctgcc tgatcctcca aat

33

<210> 145

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 145

tcctaaatcac cacaggacta

20

<210> 146

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 146

atcgcccaca tcactcgaga

20

<210> 147

<211> 17

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 147
ctcaccagac gcctcaa

17

<210> 148

<211> 29

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 148
ttacggatca tttctctact cagaaacct

29

<210> 149

<211> 18

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 149
atctgcctct tcctacac

18

<210> 150

<211> 16

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 150
ccatgcacta ctcacc

16

<210> 151

<211> 17

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 151
tcctccaaat caccaca

17

<210> 152

<211> 17

<212> ADN

<213> Gadus ogac

<400> 152

catgctaacg gtcctc

17

<210> 153

<211> 20

<212> ADN

<213> Gadus ogac

<400> 153

tttttatttg tctctatata

20

<210> 154

<211> 19

<212> ADN

<213> Gadus ogac

<400> 154

tttgtctcta tatacatat

19

<210> 155

<211> 18

<212> ADN

<213> Bison bison

<400> 155

cttctactta cagtaata

18

<210> 156

<211> 18

<212> ADN

<213> Bison bison

<400> 156
cgggtcttat accttcct

18

<210> 157

<211> 17

<212> ADN

<213> Lepus europaeus

<400> 157
tcctaactgg cttat

17

<210> 158

<211> 23

<212> ADN

<213> Lepus europaeus

<400> 158
ggctctctat tgggattatg cct

23

<210> 159

<211> 18

<212> ADN

<213> Lepus europaeus

<400> 159
aataatccag atcctaac

18

<210> 160

<211> 16

<212> ADN

<213> Lepus europaeus

<400> 160
ctaataatcc agatcc

16

<210> 161

<211> 22

<212> ADN

<213> Lepus europaeus

<400> 161
gactcattcg ttacttacac gc

22

<210> 162

<211> 26

<212> ADN

<213> Euthynnus pelamis

<400> 162
tatacccctg acgtagaatc agcctt

26

<210> 163

<211> 19

<212> ADN

<213> Euthynnus pelamis

<400> 163
atttactccc atattggcc

19

<210> 164

<211> 18

<212> ADN

<213> Euthynnus pelamis

<400> 164
ctgcatttac tcccatat

18

<210> 165

<211> 16

<212> ADN

<213> *Macropus giganteus*

<400> 165

attctttata tgccta

16

<210> 166

<211> 16

<212> ADN

<213> *Macropus giganteus*

<400> 166

tctttatatg cctatt

16

<210> 167

<211> 16

<212> ADN

<213> *Macropus giganteus*

<400> 167

ctttggctcg ctacta

16

<210> 168

<211> 16

<212> ADN

<213> *Macropus giganteus*

<400> 168

ttggctcgct actagg

16

<210> 169

<211> 16

<212> ADN

<213> Macropus giganteus

<400> 169
atattcttta tatgcc

16

<210> 170

<211> 20

<212> ADN

<213> Merluccius merluccius

<400> 170
ctatttctag cgatacatta

20

<210> 171

<211> 23

<212> ADN

<213> Merluccius merluccius

<400> 171
tcctacttat tcatagagac ctg

23

<210> 172

<211> 17

<212> ADN

<213> Merluccius merluccius

<400> 172
aacggcgctt ctttctt

17

<210> 173

<211> 24

<212> ADN

<213> Merluccius merluccius

<400> 173

aggcctctgc ttagccgcc aaat

24

<210> 174

<211> 22

<212> ADN

<213> Merluccius merluccius

<400> 174

ctcatccgctc gtacacatct gc

22

<210> 175

<211> 23

<212> ADN

<213> Merluccius merluccius

<400> 175

ggagttgtac tattcctttt agt

23

<210> 176

<211> 19

<212> ADN

<213> Merluccius merluccius

<400> 176

ttagccgcc aaatcttaa

19

<210> 177

<211> 34

<212> ADN

<213> Merluccius merluccius

<400> 177

cattataccg caaacgtcga gatagctttc tcat

34

<210> 178

<211> 16

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 178
tcaatgtttt ttatct

16

<210> 179

<211> 17

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 179
tcctctgtta cccatat

17

<210> 180

<211> 24

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 180
gtaatccttc tgctcacagt aata

24

<210> 181

<211> 17

<212> ADN

<213> Macropus rufus

<400> 181
ggctcatatc tctacaa

17

<210> 182

<211> 17

<212> ADN

<213> Macropus rufus

<400> 182
aggagcctgc ttaatta

17

<210> 183

<211> 16

<212> ADN

<213> Macropus rufus

<400> 183
gattgatccg caatct

16

<210> 184

<211> 16

<212> ADN

<213> Macropus rufus

<400> 184
tacggctgat tgatcc

16

<210> 185

<211> 16

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 185
gtttgccaca tctgcc

16

<210> 186

<211> 17

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 186
ctatgttttag ctaccca

17

<210> 187

<211> 20

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 187

tatacctccg acatttcaac

20

<210> 188

<211> 16

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 188

cctggaatat cggagt

16

<210> 189

<211> 16

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 189

tcattcgaaa catcca

16

<210> 190

<211> 19

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 190

ttgtactttt acttctcac

19

<210> 191

<211> 16

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 191
gctcgtacct ctacaa

16

<210> 192

<211> 17

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 192
gagttgtact tttactt

17

<210> 193

<211> 20

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 193
cgagatgtta gttacggctg

20

<210> 194

<211> 18

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 194
gtacttctac tgttcgca

18

<210> 195

<211> 16

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 195
caggtctttt ctttagc

16

<210> 196

<211> 17

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 196
tttgggtccc ttctagg

17

<210> 197

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 197
gtctgcctaa tagtccaaat c

21

<210> 198

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 198
atcattacag gtcttttctt a

21

<210> 199

<211> 17

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 199

ttccttcatg tcggacg

17

<210> 200

<211> 18

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 200

taatagtcca aatcatta

18

<210> 201

<211> 16

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 201

attggagtac ttctac

16

<210> 202

<211> 16

<212> ADN

<213> Salmo salar

<400> 202

gagttgtact tctact

16

<210> 203

<211> 17

<212> ADN

<213> Salmo salar

<400> 203

taggcctatg tctagcc

17

<210> 204

<211> 18

<212> ADN

<213> Salmo salar

<400> 204
gatgtagct atggctga

18

<210> 205

<211> 16

<212> ADN

<213> Salmo salar

<400> 205
tacttctact tctcac
<210> 206

16

<211> 20

<212> ADN

<213> Salmo salar

<400> 206
ctcatccgta acattcacgc

20

<210> 207

<211> 16

<212> ADN

<213> Capra hircus

<400> 207
tattcatata taccgg

16

<210> 208

<211> 19

<212> ADN

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 208
taggcctgtg ccttataat

19

<210> 209

<211> 16

<212> ADN

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 209
attcaaattt tcactg

16

<210> 210

<211> 18

<212> ADN

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 210
tctctactag gcctgtgc

18

<210> 211

<211> 21

<212> ADN

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 211
tcaaattttc actggcctat t

21

<210> 212

<211> 17

<212> ADN

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 212
tgccttataa ttcaa
<210> 213

17

<211> 25

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 213
acactacacg tctgatacca taaca

25

<210> 214

<211> 17

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 214
ctatttgcag tcatagc

17

<210> 215

<211> 17

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 215
ggatcctaca ctttcct

17

<210> 216

<211> 22

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 216
atgcctcata gtacaaatcc tc

22

<210> 217

<211> 21

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 217
aaacattggg atcatcctac t

21

<210> 218

<211> 17

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 218
ttcctccatg tgggacg

17

<210> 219

<211> 16

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 219
gtatgcctca tagtac
<210> 220

16

<211> 19

<212> ADN

<213> Salvelinus alpinus

<400> 220
tcatccggaa tatccacgc

19

<210> 221

<211> 22

<212> ADN

<213> Salvelinus alpinus

<400> 221
tggagtagta ttactacttc ta

22

<210> 222

<211> 23

<212> ADN

<213> Salvelinus alpinus

<400> 222
ggcctatggtt tggccacca aat

23

<210> 223

<211> 23

<212> ADN

<213> Salvelinus alpinus

<400> 223
tacttctaac tataatgact gcc

23

<210> 224

<211> 16

<212> ADN

<213> Salvelinus alpinus

<400> 224
ttggttcact cttagg

16

<210> 225

<211> 18

<212> ADN

<213> Salvelinus alpinus

<400> 225
ttttcctctg tgtgccat

18

<210> 226

<211> 21

<212> ADN

<213> Salvelinus alpinus

<400> 226

cctctgtgtg ccatatctgc c

21

<210> 227

<211> 16

<212> ADN

<213> Salvelinus fontinalis

<400> 227

tattattact tctcac

16

<210> 228

<211> 25

<212> ADN

<213> Salvelinus fontinalis

<400> 228

tattgggta gtattattac ttctc

25

<210> 229

<211> 19

<212> ADN

<213> Salvelinus fontinalis

<400> 229

tctgtatgcc acatttgtc

19

<210> 230

<211> 20

<212> ADN

<213> Salvelinus fontinalis

<400> 230

ctcactataa tgacagcttt

20

<210> 231

<211> 23

<212> ADN

<213> *Salvelinus fontinalis*

<400> 231

tccgatattt cgacagcttt ttc

23

<210> 232

<211> 20

<212> ADN

<213> *Salvelinus fontinalis*

<400> 232

atttatatgc atatcgcccg

20

<210> 233

<211> 26

<212> ADN

<213> amorce sequence CDL

<400> 233

ccatccaaca tctcagcatg atgaaa

26

<210> 234

<211> 58

<212> ADN

<213> amorce sequence CBHT7

<400> 234

gaaattaata cgactcacta tagggagacc acacccctca gaatgatatt tgtcctca

58

<210> 235

<211> 14

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 235
gacacaacaa cagc

14

<210> 236

<211> 14

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 236
tccctagcct tctc

14

<210> 237

<211> 14

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 237
acacttgccg gaac

14

<210> 238

<211> 14

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 238
atagccacag catt

14

<210> 239

<211> 14

<212> ADN

<213> Gadus morhua

<400> 239
ataataacct cttt

14

<210> 240

<211> 20

<212> ADN

<213> amorce sequence CBL 20

<400> 240
gacctcccag ccccatcaaa

20

<210> 241

<211> 53

<212> ADN

<213> amorce séquence CBHT7 20

<400> 241
gaaattaata cgactcacta tagggagacc

atttgtcc tca

53

<210> 242

<211> 23

<212> ADN

<213> Anguilla rostrata

<400> 242
tgcctatacc ttcacattgc ccg

23

<210> 243

<211> 17

<212> ADN

<213> Auxis thazard

<400> 243
attggcgtag ttcttct

17

<210> 244

<211> 17

<212> ADN

<213> Euthynnus alletteratus

<400> 244
ggcctgttcc tcgcaat

17

<210> 245

<211> 19

<212> ADN

<213> Euthynnus alletteratus

<400> 245
tttgattta ctcacacat

19

<210> 246

<211> 32

<212> ADN

<213> Euthynnus alletteratus

<400> 246
aacattgggtg tagtacttct actcctagta at

32

<210> 247

<211> 25

<212> ADN

<213> Euthynnus alletteratus

<400> 247
acttctactc ctagtaatga taacc

25

<210> 248

<211> 17

<212> ADN

<213> Gadus ogac et Gadus macrocephallus

<400> 248
catgctaacg gtgcctc

17

<210> 249

<211> 26

<212> ADN

<213> Gadus ogac et Gadus macrocephalus

<400> 249

tttttatttg tctctatata catatt

26

<210> 250

<211> 30

<212> ADN

<213> Gadus ogac et Gadus macrocephalus

<400> 250

tatttgtctc tatatacata ttgcccgagg

30

<210> 251

<211> 17

<212> ADN

<213> Rangifer tarandus

<400> 251

tcctctgtta ctcacat

17

<210> 252

<211> 17

<212> ADN

<213> Rangifer tarandus

<400> 252

cgagacgtca attatgg

17

<210> 253

<211> 25

<212> ADN

<213> Rangifer tarandus

<400> 253
gatcctctta tttacagtaa tagct

25

<210> 254

<211> 34

<212> ADN

<213> Rangifer tarandus

<400> 254
aatattggag tgatcctctt atttacagta atag

34

<210> 255

<211> 29

<212> ADN

<213> Salmo trutta et Salmo trut

<400> 255
aatatcggag tcgtactgct acctctcac

29

<210> 256

<211> 17

<212> ADN

<213> Salmo salar

<400> 256
taggcctatg tctagcc

17

<210> 257

<211> 19

<212> ADN

<213> Salmo salar

<400> 257
gatgttagct atggctgac

19

<210> 258

<211> 20

<212> ADN

<213> *Salmo salar*

<400> 258

ctcatccgta acattcacgc

20

<210> 259

<211> 22

<212> ADN

<213> *Salmo salar*

<400> 259

gagttgtact tctacttctc ac

22

<210> 260

<211> 26

<212> ADN

<213> *Salmo salar*

<400> 260

tttattatgg ttcctatcta tataaa

26

<210> 261

<211> 23

<212> ADN

<213> *Thunnus thynnus*

<400> 261

cttatttctc agatccttac agg

23

<210> 262

<211> 15

<212> ADN

<213> *Bos taurus*

<400> 262

ctaadcctac aaatc

15

<210> 263

<211> 15

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 263
agcttcaatg ttttt

15

<210> 264

<211> 15

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 264
cggcctacta ctagc

15

<210> 265

<211> 15

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 265
cacatcccta gcctt

15

<210> 266

<211> 15

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 266
gcccacactt gccgg

15

<210> 267

<211> 15

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 267

ttgccggaac gtaca

15

<210> 268

<211> 15

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 268

gaacgtacaa tacgg

15

<210> 269

<211> 15

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 269

tgaaacacag gagta

15

<210> 270

<211> 15

<212> ADN

<213> Gadus morhua

<400> 270

tcagacatcg agaca

15

<210> 271

<211> 15

<212> ADN

<213> Gadus morhua

<400> 271

gtaataataa cctct

15

<210> 272

<211> 18

<212> ADN

<213> amorce

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)

<223> n est I

<400> 272

agangcnccg tttgcgtg

18

<210> 273

<211> 20

<212> ADN

<213> amorce

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)

<223> n est I

<400> 273

ttcttcttta tctgtntcta

20

<210> 274

<211> 15

<212> ADN

<213> amorce

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)

<223> N EST I

<400> 274

rtcncgrcar atgtg

15

<210> 275

<211> 23

<212> ADN

<213> amorce

<220>

<221> misc_feature
<222> (3)
<223> N est I

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)
<223> N est I

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)
<223> N est I

<400> 275
gtnaaytwyg gntgactnat ccg

23

<210> 276

<211> 20

<212> ADN

<213> amorce

<400> 276
cagaatgata tttgtcctca

20